

**Über die Funktionsmorphologie
normaler menschlicher Thrombocyten
unter dem Einfluß von Pharmaka**

Vergleichende Studien am Phasenkontrast- und Elektronenmikroskop

Karlheinz Köhl



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554010_0033

AUS DER I. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. SCHWIEGK

ÜBER DIE FUNKTIONSMORPHOLOGIE
NORMALER MENSCHLICHER THROMBOCYTEN
UNTER DEM EINFLUSS VON PHARMAKA
VERGLEICHENDE STUDIEN AM PHASENKONTRAST-
UND ELEKTRONENMIKROSKOP

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Karlheinz Köhl
aus
Schöllkrippen



München 1957

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referenten: Priv. Doz. Dr. R. MARX und
Professor Dr. H. SCHWIEGK
Dekan : Professor Dr. W. BÜNGELER

Tag der mündlichen Prüfung: 28.1.1958

INHALTSÜBERSICHT

TEIL I (Text)

	Seite
A. EINLEITUNG	7
B. METHODIK	9
Der Versuchsgang in kurzer Übersicht	9
Einzelheiten der Methodik zur Darstellung haftender Thrombocyten	10
Einzelheiten der Methodik zur Darstellung freischwebend fixierter Thrombocyten	14
Registrierung der Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit (BSG)	16
Die lichtmikroskopische Untersuchung	16
Die elektronenoptische Untersuchung	16
C. ERGEBNISSE	18
Möglichkeit und Art die funktionsmorphologischen Phänomene Adhäsion, Evolution und Agglutination zu beurteilen	18
Quantitative Ergebnisse in Tabellenform mit kurzem Text über das Verhalten von Thrombocyten bei Einwirkung von	
1) Na-Citrat und Substanzen gleichartiger Wirkung im Vergleich zur Nativblut-Norm	26

	Seite
2) Heparinen	29
3) Heparinoiden	32
4) Sequestrensalzen	35
5) sequestren-ähnlichen Substanzen (Sequestrenoide)	39
Das Verhalten von Thrombocyten bei Thromb- asthenie NAEGELI als Vergleich	42
D. ZUSAMMENFASSUNG	43
E. DISKUSSION	46
TEIL II (Abbildungen)	49-113
LITERATURVERZEICHNIS	115
LEBENS LAUF	116

TEIL I (Text)

EINLEITUNG

In den letzten Jahren wurden durch verschiedene Autoren des In- und Auslandes wertvolle Beiträge zum Problem der Funktionsmorphologie menschlicher Thrombocyten geleistet (WOLPERS, RUSKA, BESSIS, BRAUNSTEINER, KÖPPEL, BLOOM u. a.).

Auf Grund dieser Arbeiten war die Reaktionsnorm der Plättchen soweit aufgeklärt, dass Abweichungen von dieser Norm beurteilt werden konnten: Abweichungen einerseits seitens der Natur durch anlagebedingte Minderwertigkeiten der Thrombocyten (beispielsweise Thrombasthenie NAEGELI), andererseits im Experiment erzeugt durch Eingriffe chemischer oder physikalischer Art (FONIO und Mitarbeiter).

Im Hinblick auf die klinische Bedeutung ist vor allem die thrombocyto-trope Wirkung der Anticoagulantien von Interesse. Die vorliegende Arbeit prüft sowohl Calcium-fällende Substanzen (zur Blutkonservierung) als auch Heparine und Heparinoide (mit antithrombotischer Wirkung durch Fermentblockade).

Besonders berücksichtigt ist auch Sequestren, das immer mehr an Bedeutung gewinnt, da es nicht nur Calcium-bindende Wirkung entfaltet.

Mit geeigneter Methodik wurde die Funktionsmorphologie menschlicher Thrombocyten unter dem Einfluss dieser Pharmaka in vitro vergleichend untersucht.

Da die Prüfung des Funktionszustandes einer Zelle nur bedingt möglich ist, wird ihre Morphologie als (postuliertes) Korrelat des funktionellen Verhaltens in die Beurteilung mit einbezogen. So ist der Begriff "Funktionsmorphologie" allgemein zu verstehen. Im vorliegenden konkreten Fall wurde funktionsmorphologisch beurteilt das Verhalten von Thrombocyten (in vitro beeinflusst durch Pharmaka), die der Blutbahn entnommen mit körperfremden Oberflächen in Berührung kommen oder frei im entnommenen Blut schweben.

Für diese komplexe Geschehen sind drei Phänomene charakteristisch:

- | | | |
|----------------------------------|---|--|
| 1) die Adhäsion
= Klebrigkeit | : | Vermögen der Thrombocyten
an Oberflächen zu haften, |
| 2) die Agglutination | : | Vermögen der Plättchen mit-
einander zu verklumpen, |
| 3) die Evolution | : | morphologische Veränderung
der Thrombocyten vom Zeit-
punkt ihrer Entnahme aus der
Blutbahn an. |

Es ist zu betonen, dass diese Phänomene an gefassfremden Oberflächen beobachtet werden. Damit sind Regulationsvorgänge ausgeschaltet, die eventuell bei intravasaler Anwendung der Pharmaka auftreten. Die Versuchsergebnisse lassen daher nicht ohne weiteres auf das Verhalten in vivo schliessen, jedoch ist zumindest vorläufig prinzipielle Ähnlichkeit zu erwarten.

METHODIK

Von der Methodik muss verlangt werden, dass sie es ermöglicht, funktionelles Verhalten und Morphologie der durch verschiedene Pharmaka beeinflussten Thrombocyten so hinreichend genau zu registrieren, dass bei Reproduzierbarkeit der Ergebnisse deren unterschiedliches Ausfallen als pharmakospezifischer Effekt gedeutet werden darf.

Prüft man das Verhalten von Thrombocyten gegen eine gefässfremde Fläche, so muss für diese Testoberfläche Konstanz der Beschaffenheit in physikalischer und chemischer Hinsicht gewährleistet sein.

Als Testfläche wurde Zaponlackfolie benutzt, da hierbei im Gegensatz zur sehr komplexen Beschaffenheit von Glasoberflächen angenommen werden kann, dass unter gleichen äusseren Bedingungen stets ein gleicher Oberflächenzustand entsteht.

Der Versuchsgang in kurzer Übersicht

Auf einer Zaponfolie wurde Blut, vermischt mit der jeweiligen bei der Blutentnahme zugesetzten Testsubstanz, aufgebracht und bei Zimmertemperatur 30 Minuten in feuchter Kammer dort belassen. Nach Abspülen aller nicht haftenden Blutbestandteile wurden die auf der Testfläche klebenden Thrombocyten 45 Minuten nach der Extravasation mit Osmiumsäure fixiert und die Präparate zur Eluierung kristallbildender Salze mit aqua dest. nachgewaschen.

Dieses Verfahren gestattet, Aussagen über die Funktionsmorphologie der mit der Testoberfläche in Kontakt gekommenen Thrombocyten zu machen, sagt prima vista jedoch nichts über das morphologische Verhalten der in der Blutschicht über der Folie freischwebenden Plättchen aus, da diese - wie man zunächst anzunehmen berechtigt ist - mit abgespült werden (hierauf wird später noch einmal eingegangen).

Aus diesem Grunde wurden auch Präparate angefertigt, die unter sonst analogen Versuchsbedingungen Thrombocyten in freischwebendem Zustand fixiert zeigen.

Für die Untersuchung der Blutplättchen erwies sich das Phasenkontrastverfahren anderen lichtoptischen Untersuchungsmethoden überlegen, weil die Plättchen durch ihren hohen Gehalt an Ribonukleinsäure (GREEN) gegenüber der Umgebung einen kleinen Brechungsindexunterschied, jedoch nur geringe Absorption haben.

Die entstehenden Kontraste entsprechen der biochemischen Struktur.

Wenn die Beurteilung morphologischer Details im Lichtmikroskop durch auftretende Beugungserscheinungen oder ungenügendes Auflösungsvermögen nicht eindeutig oder unmöglich war, wurde bei einem Teil der Präparate die Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop fortgesetzt.

Einzelheiten der Methodik zur Darstellung haftender Thrombocyten

a) Technik der Folienherstellung:

Zaponlack (= 2 %ige Lösung von Collodium in Amylacetat mit Zusatz von ca 5 Vol. % absol. Alkohol der besseren Löslichkeit wegen) wurde auf einen mit Äther entfetteten und mit einem fettfreien Leinenlappen nachpolierten Objektträger aufgetropft bis die Glasfläche völlig bedeckt war. Über eine Schmalseite wurde die Flüssigkeit abgegossen und mit einigen zusätzlichen Tropfen etwa noch haftende Staubteilchen abgeschwemmt. Der Objektträger wurde mit einem Ende auf einem Glasstab (Neigung ca 10 Grad), mit dem anderen Ende auf Filterpapier aufgelegt und in einer Petrischale luftgetrocknet.

Auf der nicht belegten Seite wurde mit Fettstift ein ca 1 cm breiter mittlerer Langsstreifen markiert. In Petrischalen staubfrei und trocken aufbewahrt blieben die Folien lange Zeit unverändert verwendbar.

b) Blutentnahme und Zusatz der Testsubstanz:

Aus Gründen der Versuchskonstanz wurden für alle Untersuchungen Blut der gleichen blutnormalen Versuchsperson (Autor) benutzt. Für Erkrankungen irgendwelcher Art (eventuell mit Einfluss auf die Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit) bestand während der Zeit der Untersuchungen kein Anhalt. Bei Vorversuchen mit Blut anderer blutnormaler Personen wurden über -

einstimmende Ergebnisse erzielt.

Pathologisches Blut, nur in einem Fall verwendet, zeigte funktionemorphologische Analogie zu einem pharmakospezifischen Effekt.

Mit V2A-Stahlnadeln (Nr. 1 oder 2) wurde bei angelegtem Venenstau eine Armvene punktiert, das Blut in 5 ccm Rekord-Spritzen langsam aufgezogen und sofort gut mit der in der Spritze vorgelegten Testsubstanzlösung durchmischt.

Das Volumenverhältnis von Testsubstanzlösung zu Blut betrug 1:9. In einigen Fällen erforderte die Verwendung der handelsüblichen Stammlösungen (der Testsubstanz) auch das Verhältnis 1:4, um gewünschte Konzentrationen erreichen zu können. Diese Abweichungen von der Verdünnungsnorm wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Wurde die Konzentration einer Substanz variiert, so kam für diese Versuchsreihe stets das gleiche Volumenverhältnis zur Verwendung.

Verdünnungen erfolgten ausschliesslich mit physiologischer Kochsalzlösung.

Um die Einwirkung der Testsubstanz auf die Thrombocyten vor ihrem Kontakt mit der Folie zu gewährleisten, wurde das Testblut 10 Minuten bei Zimmertemperatur in der Spritze gelassen und während dieser Zeit mehrmals durchmischt. Dies konnte jedoch nur bei Testsubstanzen mit gerinnungshemmender Wirkung eingehalten werden, wie sie auch vorwiegend zur Untersuchung gelangten. In den Fällen, in denen Gerinnung zu erwarten war (Nativblut, niedrige Substanzkonzentrationen, Substanzen ohne gerinnungshemmenden Effekt), wurde das Blut bereits nach 2 Minuten auf die Folie aufgebracht.

c) Beschickung der Testfläche (Folie) mit dem Testblut:

Auf den markierten Mittelstreifen der Folie wurde das Blut aus der Spritze (ohne Nadel) Tropfen an Tropfen vorsichtig aufgespritzt, bis die markierte Fläche mit einer ca 2 mm hohen Blutschicht bedeckt war. In einer Petrischale (als feuchte Kammer geschlossen) blieb das Blut 30 Minuten bei Zimmertemperatur ($18-22^{\circ}\text{C}$) auf der Folie. Für zwei Präparate waren 2-3 ccm Blut

nötig. Der Rest des Testblutes fand, soweit möglich (Gerinnung!), meist zur Bestimmung der Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit Verwendung.

d) Abspülen der nicht haftenden Blutbestandteile von der Testfläche:

Um ein Abschwimmen der Zaponfolie vom Objektträger unmöglich zu machen, wurde das Blut nicht indirekt durch Tauchen (KÖPPEL), sondern durch direktes Abspülen von der Folie gewaschen.

Der schräg aufgelegte Objektträger wurde mit 50 ccm Waschflüssigkeit von oben nach unten vorsichtig abgespült (Abb 1). Dauer ca 2 Minuten.

Um zu verhindern, dass Flüssigkeit zwischen Folie und Glasoberfläche gelangt (Abschwimmen!), wurde so abgespült, dass die Ränder des Objektträgers nicht benetzt wurden.

In den Fällen, in denen das Blut auf der Folie geronnen war (beispielsweise Nativblut), wurde der Blutkuchen unterspült und abgeschwemmt.

Das abgespülte Präparat wurde bis zur gemeinsamen Fixierung aller Präparate der Versuchsreihe (meist vier) in die feuchte Kammer zurückgelegt.

Als Waschflüssigkeit fand physiol. Kochsalzlösung Verwendung, die in der gleichen Konzentration wie das Versuchsblut Testsubstanz enthielt, damit deren Einwirkung auf die Thrombocyten bis zum Augenblick ihrer Fixierung erhalten blieb.

Ringer-Lösung bewährte sich nicht, da bei Zugabe mancher Testsubstanzen Karbonate ausfielen, die als schwer wasserlöslich auf der Folie haften blieben.

Nach Abspülen mit 50 ccm Waschflüssigkeit erwies sich die Folie von Bluteiweissen hinreichend sauber, auch für elektronenoptische Untersuchungen.



Abbildung 1 : Abspülen des Testblutes von der Testfläche

e) Fixierung haftender Thrombocyten:

Als Fixierungsmittel wurde Osmiumsäure-Dampf (OsO_4) benutzt. Dieses Verfahren gilt als "schonendste" Fixierungsmethode für biologische Objekte.

10g 2%ige Osmiumsäure wurden in eine Petrischale von 8 cm Durchmesser gegossen und diese in einer grösseren Petrischale (12 cm Durchmesser, 3 cm hoch) an den Rand gestellt. Die Objektträger wurden mit Schicht nach innen am freien Rand der grossen Schale aufgestellt. Eine Fixierungszeit von 2 Min. in feuchter Kammer war ausreichend.

Die Osmiumsäure kann mehrmals benutzt werden, wenn die Fixierungszeit dem Absinken der Konzentration entsprechend verlängert wird. Vereinzelt auf der Folie (besonders am Rand) klebende Erythrocyten können zur Beurteilung der Fixierung benutzt werden: sie reicht aus, wenn die Erythrocyten nach dem Waschen mit aqua dest. morphologisch unverändert sind.

f) Eluierung wasserlöslicher Substanzen nach der Fixierung:

Alle Präparate wurden mit je 100 ccm aqua dest. in der gleichen Art wie beim Abspülen des Blutes nachgewaschen, um Kristallbildungen wasserlöslicher Salze auf der Folie zu verhindern. Das luftgetrocknete Präparat konnte dann untersucht werden.

Einzelheiten der Methodik zur Darstellung
freischwebend fixierter Thrombocyten

a) Gewinnung thrombocytenhaltigen Plasmas:

Aus Gründen der Versuchskonstanz lief der Versuch synchron mit der Herstellung des Haftpräparates. War die Folie nach dem oben beschriebenen Verfahren mit Testblut beschickt, so wurde das restliche Testblut (3 ccm genügen) in ein Zentrifugenglas mit flachem Boden ausgespritzt und die Sedimentation der Erythrocyten in der Zentrifuge bei niedriger Tourenzahl (400-500 U/min) beschleunigt. Nach 30 Minuten konnte thrombocytenhaltiges Plasma abpipetiert werden.

b) Fixierung der freischwebenden Thrombocyten:

Das Thrombocytenplasma wurde 1:1 mit Fixierungsflüssigkeit zur gleichen Zeit versetzt, zu der die Haftpräparate in die Fixierungskammer gebracht wurden (bei allen Versuchen 45 Min. nach der Blutentnahme).

Fixierungsflüssigkeit war eine im Labor vorrätige, nach MICHAELIS hergestellte, isotonische, gepufferte 1%ige (0,34 mol) Osmiumtetroxyd-Lösung (siehe Anmerkung). Die Fixierungszeit betrug 30 Minuten (die Eiweissbestandteile verfärbten sich bräunlich-schwarz).

c) Isolierung der freischwebend fixierten Thrombocyten:

Die Thrombocyten suspension wurde bei 2500 U/min zentrifugiert, dann der Überstand dekantiert, das Sediment mit aqua dest. aufgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis (nach insgesamt dreimaligem Waschen) die Sulfosalicylprobe auf Eiweiss im Überstand negativ war. Das letzte Sediment wurde mit wenig aqua dest. aufgeschüttelt, die Suspen-

Anmerkung:

Herstellung der Fixierungslösung nach MICHAELIS:

1) Stammlösung A

Natriumacetat	9,714 mg
Veronal-Natrium	14,714 mg
Aqua dest. ad	500,0 ccm

2) Stammlösung B

Natriumchlorid	42,5 mg
Aqua dest. ad	500,0 ccm

3) Stammlösung A 10,0 ccm

Stammlösung B 3,6 ccm

Salzsäure n/10 11,0 ccm

Aqua dest. 25,4 ccm

50,0 ccm

Zu 25,0 ccm der Lösung 3), deren pH auf 7,0 eingestellt ist, werden 0,25 g OsO_4 gegeben.

sion bis zur gewünschten Thrombocyten-dichte unter mikroskopischer Kontrolle verdünnt und auf einen mit Folie belegten Objektträger aufgetropft. Nachdem die Plättchen auf die Folie sedimentiert waren, wurde das überstehende Wasser abgegossen. Nach Trocknen an der Luft konnte das Präparat untersucht und mit dem korrespondierenden Haft-Präparat verglichen werden.

Registrierung der Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit (BSG)

Um Anhalt für eine mögliche Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch Änderung der BSG zu gewinnen, wurde diese in den meisten Fällen registriert. Dazu wurde im Versuch - wie bereits erwähnt - ein Teil des Testblutes (= Blut und Testsubstanz) abgezweigt und seine BSG nach WESTERGREEN (ohne nochmaligen Na-Citrat-Zusatz) bestimmt

Die lichtmikroskopische Untersuchung

Alle Präparate wurden zur Beurteilung der Dichte des Besatzes der Folie mit Thrombocyten pro Flächeneinheit (= Flächendichte) im Phasenkontrastmikroskop mit kleiner Vergrößerung (Objektiv 20x, Okular 8x) vollständig durchmustert, eine stärkere Vergrößerung (Objektiv 40x, Okular 10x) diente zur Differenzierung der Morphologie. Fototechnische Aufnahmen (EXAKTA), die vergleichend den Einfluss einer Testsubstanz veranschaulichen sollten, mussten einerseits ein genügend grosses Flächenstück erfassen, andererseits die Thrombocyten-Form erkennen lassen. Eine Vergrößerung mit Objektiv 20 x, Okular 15 x bei 12 cm Balg-auszug und linear 3 1/2-facher photographischer Nachvergrößerung tat beidem Genüge.

Die elektronenoptische Untersuchung

Die Benutzung von Zaponlackfolie als Testoberfläche bot den Vorteil, dass das gleiche Präparat licht- und elektronenoptisch untersucht werden konnte, da Zaponfolie als gut durchstrahlbare Trägerfläche für kleine Einzelobjekte (z.B. Kristalle) in der Elektronenmikroskopie seit langem verwendet wird.

In der üblichen Weise wurde die auf dem Objektträger haftende Folie durch Ritzen mit einer Nadel in kleine Quadrate (ca 3 mm Kantenlänge) zerteilt, durch vorsichtiges Tauchen in Wasser abschwimmen gelassen und auf feine Kupferdrahtnetze aufgefischt.

Nach der Schrägbedampfung mit Metalloxyd (Titanoxyd), die auf der Folie liegende Objekte durch Bedampfungsschatten plastisch erscheinen lässt, war das Präparat fertig zum Einschleusen ins Mikroskop.

Zur Verfügung stand ein AEG-Zeiss-Gerät Typ EM 8 mit einem Auflösungsvermögen von ca 5 m μ und den Vergrößerungsstufen 1000-(I), 3 800-(II) und 10 000-fach (III).

Stufe I wurde zu Übersichtsaufnahmen für im Präparat erscheinende oft differente Thrombocytenformen gewählt, und Stufe II erwies sich zur Differenzierung der Morphologie einzelner Plättchen als ausreichend.

ERGEBNISSE

Zur Erfassung des funktionsmorphologischen Zustandes der untersuchten Thrombocyten wurde zunächst lichtmikroskopisch ihre Adhäsion, Evolution und Agglutination im Haftpräparat beurteilt.

Die zahlenmässigen Ergebnisse werden in Tabellenform aufgeführt, wobei die untersuchten Pharmaka in Gruppen chemischer Zusammengehörigkeit oder ähnlicher Wirkung zusammengefasst sind. Einer jeweils anschliessenden kurzen Interpretation der Tabellenwerte folgen etwaige weitere Untersuchungsergebnisse (Morphologie freischwebend fixierter Plättchen, Beobachtung am Elektronenmikroskop).

Zuvor einige allgemeine Überlegungen und Versuchsergebnisse für die Möglichkeit und Art der Beurteilung.

Beurteilung der Adhäsion

Die als Adhäsion bezeichnete Teilfunktion der Thrombocyten wurde nach der Zahl der im Präparat auf der Flächeneinheit haftenden Plättchen beurteilt (=Flächendichte).

Diese Zahl wird grundsätzlich von zwei Faktoren bestimmt, nämlich einmal davon, wieviele Thrombocyten überhaupt die Möglichkeit haben mit der Testfläche in Kontakt zu kommen, und zweitens vom Grad ihrer Fähigkeit, dann dort zu haften, also von der eigentlichen Adhäsion. Diese kann daher exakt vergleichend nur gemessen werden, wenn der erste Faktor sich unter den Versuchsbedingungen als Konstante erweist.

Betrachtet man eine 3μ Blutschicht (dem Thrombocyten-Durchmesser entsprechend) über einer Fläche von 1 mm^2 , so befinden sich bei Normalblut ($5 \cdot 10^6$ Ery./ mm^3 und $3 \cdot 10^5$ Thro./ mm^3) in diesem Volumen $15 \cdot 10^3$ Ery und $9 \cdot 10^2$ Thrombocyten.

Wenn - als erste Annahme - beide Zellarten gleichzeitig sedimentieren, so decken die Ery eine Fläche von $7,54 \cdot 10^{-1}\text{ mm}^2$, die Thrombocyten nur eine Fläche von $6,4 \cdot 10^{-3}\text{ mm}^2$ (siehe Anmerkung 1).

Die Teilchen aus der ersten Schicht bedecken insgesamt also eine Fläche von ca $0,76 \text{ mm}^2$ oder 76 % der Gesamtfläche. Es kann daher für die erste Abschätzung angenommen werden, dass alle in dieser Schicht vorhandenen Blutplättchen mit der Oberfläche in Kontakt treten können.

In der zweiten 3μ Schicht ist wieder die gleiche Anzahl Teilchen vorhanden. Ihnen stehen nur unbedeckte 24 % der Gesamtfläche zur Verfügung. Wird gleichzeitig Sedimentation angenommen, so könnten noch 4300 Ery und 620 Thrombocyten die Oberfläche erreichen (siehe Anmerkung 2). Nach Sedimentation der Teilchen aus der zweiten Schicht wäre die Testoberfläche völlig bedeckt. Die maximale Flächen-dichte würde ca 1600 Thrombocyten pro mm^2 betragen.

Bei dieser theoretischen Überlegung sind die grundsätzlich nicht bekannten spezifischen Aktivierungsenergien gegen die Testoberfläche völlig ausser Acht gelassen. Ebenso ist weder die Brown'sche Molekularbewegung, noch sind thermische Strömungen berücksichtigt.

Unabhängig von Zahlenwerten ergibt sich, dass Kontaktmöglichkeit nur für eine streng begrenzte Zahl von Thrombocyten besteht.

Da die Blutschicht, der sie entstammen, sehr dünn (Grössenordnung 10μ), der maximale Sedimentationsweg also sehr klein ist, wird die Besiedlung der Fläche bereits wenige Minuten nach Aufbringen des Testblutes abgeschlossen sein. Ausserdem können sich Unterschiede in der spezifischen Sedimentationsgeschwindigkeit der Teilchen deshalb nur

Anmerkung 1: Berechnung der Flächenbesiedlung:

Erythrocyten: $15 \cdot 10^3$ (N) Teilchen mit Durchmesser von 8μ (2r) haben eine Gesamtfläche (F) von $F = N \cdot r^2 \cdot \pi =$
 $= 15 \cdot 10^3 \cdot 16\pi \cdot 10^{-6} (\text{mm}^2) = 7,54 \cdot 10^{-1} \text{mm}^2 =$
 $= 75,4 \% \text{ von } 1 \text{mm}^2.$

Thrombocyten: $9 \cdot 10^2$ Teilchen mit Durchmesser von 3μ haben eine Gesamtfläche von
 $9 \cdot 10^2 \cdot 2,25\pi \cdot 10^{-6} (\text{mm}^2) =$
 $= 6,4 \cdot 10^{-3} \text{mm}^2 = 0,64 \% \text{ von } 1 \text{mm}^2.$

geringfügig auswirken. Eine Senkungsbeschleunigung, die beiden Zellarten gleichartig zuteil wird, hat überhaupt keinen Effekt auf die Flächendichte. Bei allen Versuchen besteht daher Kontaktmöglichkeit für die gleiche Thrombocytenzahl, die limitiert wird durch das Verhalten der vorhandenen Ery als automatisches Relais, wenn nicht bestimmte Grenzwerte (für Schichtdicke und Verweildauer) unterschritten werden. Im Versuch lag die Höhe der Blutschicht mit ca 2 mm weit über dem Notwendigen; ebenso war bei 30 Minuten Verweildauer des Testblutes auf der Zaponfolie die Besiedlung abgeschlossen, wenn keine Gerinnung während dieser Zeit eintrat.

Es kann also die beobachtete Flächendichte als Mass für die Adhäsion verwendet werden. Als Normalwert (maximale Klebrigkeit) darf jedoch nicht Nativblut zu Grunde gelegt werden, weil bereits einige Minuten nach dem Kontakt des Testblutes mit der Folie die Sedimentation der Plättchen durch die eintretende Gerinnung abgestoppt wird, sondern gerinnungsgehemmtes Blut, bei dem die zugesetzte Testsubstanz aber keinen oder nur geringen Einfluss auf die Adhäsion haben darf.

Anmerkung 2: Anteilberechnung für die Besiedlung der Restfläche:

Es ist $n_1:n_2$ (n_1 Zahl der Ery, n_2 Zahl der Thromb.) proportional dem Flächenverhältnis $F_1:F_2$ (F_1 Fläche eines Ery ca $50 \mu^2$, F_2 Fläche eines Thrombocyten ca $7,1 \mu^2$).

$$n_1:n_2 = F_1:F_2 = 50:7,1 = 7,0:n_1 = 7,0 n_2$$

Ferner wird $n_1 F_1 + n_2 F_2 = F$ (F die verfügbare Restfläche; sie beträgt $0,24 \text{ mm}^2$).

Es folgt also

$$7,0 \cdot n_2 F_1 + n_2 F_2 = F; \quad n_2 (7,0 \cdot F_1 + F_2) = F;$$

$$n_2 = F : (7,0 \cdot F_1 + F_2) = 0,22 : (7,0 \cdot 50 \cdot 10^{-6} + 7,1 \cdot 10^{-6}) = 0,22 \cdot 10^6 : 357 = 620 \text{ Thrombocyten.}$$

$$n_1 = 7,0 \cdot n_2 = 4300 \text{ Erythrocyten.}$$

Die Versuchsergebnisse bestätigen weitgehend diese theoretischen Überlegungen. Die höchste Flächendichte wurde bei Blut beobachtet, das durch Zusatz von α -Heparin H (15 mg%) ungerinnbar war (Abb. 35). Sie betrug 5200 Thrombocyten pro $\text{mm}^2 = 100\%$ (siehe Anmerkung 3).

Dieser experimentelle Wert liegt, wie schon zu erwarten war, (rund viermal) höher als der theoretisch primitiv errechnete, da dieser aus folgendem Grund nur eine untere Grenze darstellen kann:

Während die Thrombocyten (der grösste Teil von ihnen jedenfalls) nach Berührung mit der Testfläche dort haften bleiben, werden die zuerst sedimentierenden Ery zwar die Oberfläche berühren, aber infolge der Brown'schen Bewegung sich wieder von ihr entfernen können (solange, bis sie durch das Gewicht nachfolgender Ery an die Fläche angeedrückt werden).

Den Plättchen wird dadurch eine grössere Fläche angeboten.

Dass die Zeitspanne für die Besiedlungsmöglichkeit nur wenige Minuten beträgt, bewies der Nativblutversuch (Abb. 7). Das Präparat zeigte die zweithöchste beobachtete Flächendichte, nämlich bereits 72 % des Maximalwertes, obwohl das Blut schon 3 bis 4 Minuten nach Aufbringen auf die Folie geronnen war.

Ein weiterer Versuch, bei dem Citrat-Blut (400 mg%) einer Patientin mit hoher Senkungsbeschleunigung (96/116 mm) jeweils 30, 60 und 120 min auf der Folie belassen wurde bestätigte, dass nach 30 min Verweildauer die Flächendichte nicht mehr ansteigt (Werte: 25%, 19% und 20%). Ferner zeigte sich im Vergleich mit dem entsprechenden Normalblutwert (26%), dass selbst eine enorm hohe BSG keinen bemerkenswerten Einfluss auf die Flächendichte hat (Abb. 3 - 6).

Anmerkung 3: Berechnung der beobachteten maximalen Flächendichte: bei einer 480-fachen Gesamtvergrösserung wurden auf einem Flächenstück von $79 \cdot 110 \text{ mm}^2$ 200 Blutplättchen gezählt. Reduziert auf wirkliche Grösse ergibt sich für das ausgezählte Flächenstück ein Wert von

$$79 \cdot 110 : 4,8^2 \cdot 10^4 = 8,7 \cdot 10^3 : 2,3 \cdot 10^5 = 0,038 \text{ mm}^2.$$

Normiert auf $1 \text{ mm}^2 : 200 : 26 = 5200 \text{ Thrombocyten pro mm}^2$.

Die zahlenmässige Erfassung der Adhäsion muss so vorgenommen werden, dass einerseits die Zahlenangaben eine gute vergleichende Übersicht über die Wirksamkeit der getesteten Pharmaka gestatten, andererseits biologisch und methodisch bedingte Schwankungen berücksichtigt werden.

Eine methodisch bedingte Fehlerquelle besteht darin, dass beim Abspülen des Blutes von der Testfläche die abdeckende Erythrocytenschicht entfernt und dabei einer Anzahl bis dahin freischwebender Plättchen kurz Kontaktmöglichkeit geboten wird. Diese Zahl sekundär klebender Plättchen wird aber bei gleicher Versuchsanordnung annähernd konstant bleiben.

Da bei verschiedenen Präparaten der gleichen Testsubstanz (gleiche Konzentration) und innerhalb des gleichen Präparates selbst oft Schwankungen in der Flächendichte von $\pm 10\%$ beobachtet wurden, erscheint die Angabe absoluter Zahlenwerte wenig sinnvoll. Daher wird die durch Auszählen ermittelte Zahl der pro Flächeneinheit jeweils haftenden Thrombocyten in Vergleich gesetzt, zur beobachteten maximalen Flächendichte (5200 Plättchen pro $\text{mm}^2 = 100\%$, bei Blut mit Zusatz von $15\text{mg}\% \alpha\text{-Heparin H}$). Prozentstufen von je 20% werden zu einer Indexzahl zusammengefasst, ausgenommen die Stufe $0\% - 5\%$, die eine eigene Indexzahl erhält.

Einteilung:	Prozentzahl	Indexzahl
	0 - 5	0
	6 - 20	I
	21 - 40	II
	41 - 60	III
	61 - 80	IV
	81 - 100	V

Beurteilung der Evolution

Die Evolution der Thrombocyten (auf einer Oberfläche) ist ein dynamischer Vorgang, der im fixierten Präparat, das nur eine Momentaufnahme darstellt, nicht ohne weiteres statistisch zu erfassen ist. Sie spielt sich so ab - wie KOEPPPEL am Nativblut zeigen konnte -, dass die intravasal vorhandene Zirkulationsform (rundovale Scheibe aus homogenem Plasma) zunächst Entmischungserscheinungen zeigt, dann feine Pseudopodie ausbildet. Später wird die Differenzierung in Granulomer (dichtes, körniges Zentrum) und Hyalomer (dünne, strukturlose Peripherie) immer deutlicher erkennbar, und das Fortschreiten der Evolution besteht in der Veränderung der Hyalomer-Granulomer-Relation zu Gunsten des Hyalomers. Thrombocyten, bei denen diese Relation grösser als eins ist, werden als voll ausgebreitete Formen bezeichnet.

Diesen Zustand haben bei Nativblut meist alle Plättchen nach 30 Minuten erreicht (KÖPPEL).

Die Evolution vollzieht sich unabhängig von der Gerinnung.

Der Einfluss eines Pharmakons auf die Thrombocyten zeigt sich in der Veränderung ihrer Evolutionsgeschwindigkeit im Sinne einer Verzögerung.

Da mit Sicherheit nicht alle Plättchen genau gleichartig auf das Pharmakon reagieren, werden bei geringer Hemmung der Evolutionsgeschwindigkeit immer noch - wenn auch weniger - vollausgebreitete Formen auftreten. Wird die Hemmung stärker, so erscheinen nur noch Teilausbreitungsformen; hemmt das Pharmakon die Evolution vollständig, so müssen Zirkulationsformen beobachtet werden können.

Mit folgender Einteilung der Thrombocyten in vier Gruppen lassen sich nach der Morphologie Beginn, Verlauf und Ende der Evolution zahlenmässig erfassen:

- | | | |
|------------------------|---|---|
| 1) Zirkulationsform | : | bei lichtmikroskopischer Betrachtung morphologisch mit der intravasalen Zirkulationsform identisch. Da das Lichtmikroskop feine Pseudopodien nicht mehr auflöst, besser als "mögliche Zirkulationsform" bezeichnet. |
| 2) Sternform | : | Pseudopodien erkennbar, jedoch noch kein Hyalomer vorhanden. |
| 3) Ausbreitungsform I | : | Hyalomer erkennbar; Hyalomer-Granulomer-Relation noch kleiner oder gleich 1. |
| 4) Ausbreitungsform II | : | Hyalomer grösser als Granulomer. |

Nach diesem Schema wurden die pro Flächeneinheit klebenden Thrombocyten prozentual aufgeschlüsselt. Das Verhältnis dieser vier Prozentzahlen wird in der tabellarischen Ergebnisübersicht als "Evolutionen-Verhältnis" aufgeführt (Zirkulationsform : Sternform : Ausbreitungsform I : Ausbreitungsform II).

Als direktes Mass für den Grad der Evolutionshemmung erscheint die Angabe des Prozentsatzes an voll ausgebreiteten Thrombocytenformen (Form II) sinnvoll.

Es ist jedoch eine konstante Zahl sekundär klebender Plättchen vorhanden, deren Ausbreitung noch gar nicht beendet sein kann, weil sie erst kurz vor ihrer Fixierung mit der Testfläche in Berührung kamen. Um diesen Prozentsatz zu berücksichtigen, wird die höchste überhaupt beobachtete Prozentzahl an Ausbreitungsform II gleich 100% gesetzt. Wie zu erwarten war, wurde dieses Maximum bei Nativblut gefunden. Die beobachtete Prozentzahl an Ausbreitungsform II betrug 78%. Auf diesen Nativblut-Wert (gleich 100% gesetzt) sind alle anderen Werte als "Evolutionen-Prozentzahl" umgerechnet.

Aus den gleichen Gründen wie bei der Adhäsion und, um den subjektiven Fehler bei der Einteilung in die vier Gruppen zu berücksichtigen, werden auch hier Prozentstufen in Indexzahlen (O - V) zusammengefasst.

Beurteilung der beobachteten Agglutination

Bei der Erfassung der Adhäsion wurde aufgetretene Agglutination der Thrombocyten mitregistriert. Sie wird in der tabellarischen Ergebnisübersicht ihrer Stärke nach wie folgt angegeben:

- Ø kein Agglutinat auf der Testfläche beobachtet
- (+) ganz vereinzelt Agglutinate; Masse der Thrombocyten klebt singulär
- +
- vereinzelt Agglutinate bei immer noch starkem überwiegen der Einzelkleber
- ++ einzeln liegende und agglutinierte Plättchen etwa im Verhältnis 1:1
- +++ Zahl der agglutinierten Thrombocyten überwiegt.

Das darunter stehende Zahlenpaar, beispielsweise 2-10, gibt Minimum und Maximum der Thrombocytenzahlen an, aus denen sich die beobachteten Agglutinate zusammensetzten.

Es sei darauf hingewiesen, dass mit der benutzten Methodik die Agglutination nicht quantitativ erfasst werden konnte, da lediglich die auf der Testfolie haftenden Agglutinate registriert wurden.

Den gefundenen Werten kommt daher nur relative Gültigkeit zu.

1) Das Verhalten von Nativblut-Thrombocyten und ihre Beeinflussung durch Na-Citrat und Substanzen gleichartiger Wirkung.

Abbildungen 7 - 29

Testsubstanz (mg% im Blut)	Adhäsion		Evolutions- Verhältnis (%)	Adhäsion		Aggluti- nation	BSG (mm)
	Proz. - zahl	Index- zahl		Proz. - zahl	Index- zahl		
Nativblut	72	IV	0/3/19/78	100	V	++ 2-10	-
Na-Citrat 10	65	IV	0/3/21/76	98	V	++ 2-10	-
50	43	III	0/27/31/42	54	III	+ 2-5	-
100	45	III	1/5/25/69	88	V	+ 2-5	-
200	70	IV	3/7/22/68	87	V	+ 2-5	8/12
400	26	II	0/19/42/39	50	III	(+) 2-3	1/4
800	29	II	0/11/48/41	52	III	Ø	2/5
Na-Oxalat 200	70	IV	4/10/34/52	67	IV	+ 2-5	2/5
"Thrombo- solum" 200	69	IV	2/3/29/66	85	V	+ 2-5	3/6

ad 1) Das Verhalten von Nativblut-Thrombocyten und ihre Beeinflussung durch Na-Citrat und Substanzen gleichartiger Wirkung

Nativblut-Thrombocyten erreichten wegen der eingetretenen Gerinnung keine maximale Adhäsion, jedoch war die Evolution durchweg vollständig erfolgt.

Na-Citrat in einer Konzentration von 10 mg% zugesetzt zeigte keinen oder nur geringen Effekt.

Bei Steigerung der Konzentration (50 und 100 mg%) sank die Adhäsion auf die Hälfte des Maximalwertes ab, erreichte bei 200 mg% erneut den Nativblut-Wert, fiel aber bei weiterer Konzentrationssteigerung (400 und 800 mg%) grenzwertartig auf ca ein Viertel ab.

Die Agglutination nahm dabei ständig an Zahl und Grösse der Agglutinate ab und verschwand schliesslich ganz (bei 800 mg%). Die Evolution wurde bis zu einer Konzentration von 200 mg% nur unwesentlich beeinflusst (ausgenommen Konz. 50 mg%) und sank erst von 400 mg% an auf 50% als Grenzwert ab.

Hemmung der Evolution um 50% besagt nach der einleitenden Definition lediglich, dass die Hälfte der nach 30 min Verweildauer auf der Testfläche haftenden Plättchen sich im Stadium der Ausbreitungsform II befanden. Dass diese Beeinflussung der Evolution nur eine zeitliche Verzögerung darstellte, konnte im Versuch nachgewiesen werden; wurde Na-Citrat-Blut (400 mg%) 2 Std auf der Folie belassen (Abb. 5), so hatten nach dieser Zeit alle Plättchen volle Ausbreitung (100%) erreicht.

Na-Oxalat und "Thrombosolum" zeigten bei einer Konzentration von 200 mg% gleichsinnige Wirkung wie Na-Citrat (Abbn 21-23).

Die Werte der BSG lagen für diese Substanzgruppen bei allen Konzentrationen im Bereich der Norm.

Freischwebend fixierte Citrat-Thrombocyten (400 mg%) liessen bei Beobachtung im Lichtmikroskop (Abb 14) nicht immer Pseudopodien erkennen (lichtmikroskopisch: mögliche Zirkulationsformen), jedoch zeigte sich bei der elektronenoptischen Untersuchung (Abbn 19, 20), dass alle Plättchen teils kleine zackenförmige Plasma-Ausstülpungen, teils kräftige Pseudopodien (bis zu 3 μ Länge) oder beides ausgebildet hatten (Sternformen).

Zirkulationsformen konnten weder hierbei noch bei der Untersuchung des Haftpräparates (Abbn 15-18) nachgewiesen werden. Es wurden grossflächige Ausbreitungsformen beobachtet (Durchmesser bis 10 μ), deren Granulomer meist schon aufgelockert oder ringförmig auseinandergetreten war. Teilweise zeigten die Plättchen sogar bereits im Zentrum Auflösung (zentrales Loch). Neben der Ausbreitungsform II konnte auch Form I nachgewiesen werden: dichtes Granulomer mit Pseudopodien und kleinem Hyalomere (Abb 18).

Die Morphologie von Thrombocyten unter dem Einfluss von Na-Oxalat und "Thrombosolum" (Abbn 24-29) war mit der eben beschriebenen weitgehend identisch.

Anmerkung:

Na-Citrat	:	3,8 %ige, isotone Stammlösung (kliniksüblich)
Na-Oxalat	:	1,34 %ige, isotone Stammlösung (kliniksüblich)
"Thrombosolum":		Tri- β -oxyaethyl-(- β -oxypropan- α , β , γ -tricarbonsaures) Ammonium; 5 %ige wässrige Stammlösung.

2) Die Wirkung von Heparinen auf Thrombocyten.

Abbildungen 30 - 39

Testsubstanz (mg% im Blut)	Adhäsion		Evolutions- Verhältnis (%)	Evolution		Aggluti- nation	BSG (mm)
	Proz. - zahl	Index- zahl		Proz. - zahl	Index- zahl		
α-Heparin "Novo" 15	35	II	8/19/54/19	24	II	++ 2-15	2/6
50	45	III	0/21/60/19	24	II	+++ 2-25	-
100	36	II	7/33/53/7	9	I	+++ 2-50	-
200	31	II	1/23/62/14	18	I	(+) 2-3	-
α-Heparin H 15	100	V	3/6/46/45	58	III	++ 2-5	1/2
"Elheparin" 15	38	II	27/11/13/49	63	IV	+ 2-5	2/8

ad 2) Die Wirkung von Heparinen auf Thrombocyten

Schon bei niedriger Konzentration (15 mg%) sank unter dem Einfluss von α -Heparin "Novo" die Adhäsion der Plättchen auf ein Drittel ab und behielt bei Konzentrationssteigerung (bis zu 200 mg%) diesen Wert ziemlich unverändert bei (Abbn 30 - 33).

Die Evolution zeigte auch von Anfang an deutliche Beeinflussung. Die zunächst konstante Evolutionshemmung auf ein Viertel der Nativblut-Evolutionszahl (bei 15 und 50 mg%) verstärkte sich bei einer Konzentration von 100 mg% sogar auf 10%, wahrscheinlich bedingt durch aufgetretene starke Agglutination, denn mit Nachlassen der Agglutination bei Verdoppelung der Konzentration stieg die Evolution wieder auf 20% an.

Deutliche Agglutinationsneigung bestand bereits bei niedriger Konzentration (15 mg%), die sich bei Erhöhung der Heparindosis sowohl nach Zahl als auch nach Grösse der Agglutinate verstärkte (bei 100 mg% wurden sehr grosse Verschmelzungs-Agglutinate beobachtet). Erst bei sehr hoher Konzentration (200 mg%) verschwand die Agglutination fast völlig.

Drei Heparine im Vergleich zeigten bei einer (im therapeutischen Bereich liegenden) Konzentration von 15 mg% wenig Gemeinsamkeit im Effekt (Abbn 34-36).

α -Heparin "Novo" und "Elheparin" verminderten die Adhäsion auf ein Drittel, α -Heparin H zeigte dagegen die höchste überhaupt beobachtete Klebrigkeit.

Die Evolutionszahl sank unter dem Einfluss von α -Heparin "Novo" auf ein Drittel, durch α -Heparin H und "Elheparin" nur auf zwei Drittel ab.

Agglutinationstendenz bestand bei allen dreien, bei "Elheparin" war sie am geringsten.

Die Werte der BSG waren bei allen Versuchen in dieser Gruppe unauffällig.

Zirkulationsformen waren für α -Heparin "Novo" und α -Heparin H dem lichtoptischen Befund nach nicht zu erwarten und konnten auch am Elektronenmikroskop nicht nachgewiesen werden. Die Thrombocyten unter Heparin "Novo"-Einwirkung (15 mg%, Haft-

präparat) befanden sich in der Mehrzahl im Ausbreitungsstadium I. Form II zeigte meist noch kompaktes oder eben aufgelockertes Granulomer (Abbn 37-40). Vereinzelte Sternformen (nur Pseudopodien, kein Hyalomer) bewiesen morphologisch, dass einige Plättchen sekundär kleben: ihre Pseudopodien waren nicht radiär zum Zentrum (Granulomer) ausgerichtet, sondern ungeordnet, und lagen manchmal auf den Ausbreitungsformen auf (Abb 40). Diese Sekundärkleber entsprechen praktisch freischwebend fixierten Plättchen.

Bei "Elheparin" bestand die Möglichkeit für im Haftpräparat vorhandene Zirkulationsformen (lichtoptisch 25%). Es wurde jedoch elektronenoptisch nicht untersucht, da die Hälfte der haftenden Plättchen bereits als Ausbreitungsform II vorlag.

Anmerkung:

- | | |
|---------------------|--|
| α -Heparin "Novo" : | Na-Mucoitinpolysulfat
5 %ige Stammlösung |
| α' -Heparin H : | Versuchspräparat,
5 %ige wässrige Stammlösung |
| "Elheparin" : | aus tierischen Organen hergestelltes Heparinkörper-Präparat,
5 %ige Stammlösung |

3) Heparinoide in ihrer Wirksamkeit auf Thrombocyten.

Abbildungen 41 - 50

Testsubstanz (mg% im Blut)	Adhäsion		Evolutions- verhältnis (%)	Evolution		Aggluti- nation	BSG (mm)
	Proz. - zahl	Index- zahl		Proz. - zahl	Index- zahl		
Polyaethen- sulfosäure 15	31	II	8/11/23/58	74	IV	+ 2-7	2/5
Dextran- sulfat 15	50	III	6/13/52/29	37	II	(+) 2-5	2/5
Laevan- sulfat 15	39	II	12/17/43/28	36	II	+ 2-50	1/4
Heparinoid G I 15	19	I	2/16/24/58	74	IV	(+) 2-5	2/4
Heparinoid G II 15	64	IV	0/6/35/59	76	IV	+ 2-5	1/4
Novocain- Heparinoid 15	54	III	4/11/30/55	71	IV	+ 2-7	1/4
"Thrombocid" 15	51	III	19/31/45/5	6	I	+ 2-7	1/4

ad 3) Heparinoide in ihrer Wirksamkeit auf Thrombocyten

Die vergleichende Untersuchung verschiedenartiger Heparinoide bei konstanter Konzentration (15 mg%) liess kaum gemeinsame Tendenz in der Wirksamkeit erkennen (Abbn 41-47). Es verursachten zwar alle Substanzen eine Verminderung der Adhäsion, doch schwankte deren Grad erheblich. Das Heparinoid G II setzte sie um ein Drittel, Dextransulfat, "Thrombocid" und Novocain-Heparinoid um die Hälfte, Laevansulfat und Polyaethensulfosäure um zwei Drittel herab. Am stärksten war die Klebrigkeit durch Heparinoid G I auf nur noch 20% vermindert.

In ihrer Wirkung auf die Evolution der Plättchen unterschieden sich die untersuchten Substanzen noch stärker. Die Heparinoide G I und G II, Novocain-Heparinoid und Polyaethensulfosäure verminderten die Evolution nur um ein Viertel, Dextran- und Laevansulfat dagegen um zwei Drittel. Ganz starken Effekt zeigte "Thrombocid", das Ausbreitungsform II fast nicht mehr auftreten liess.

Bei allen Heparinoiden war die Agglutinatbildung deutlich geringer als bei Heparinen. Bei Laevansulfat wurden grössere, bei "Thrombocid" kleinere Verschmelzungs-Agglutinate beobachtet.

Die Werte der BSG lagen für diese Substanzgruppen gleichartig im Bereich der Norm.

Lohnend für die elektronenoptische Untersuchung erschien aus dieser Gruppe lediglich das "Thrombocid"-Haftpräparat (Abbn 48-50).

Die beobachteten Thrombocyten lagen meist im Stadium des Evolutionsbeginns vor: Homogenes, undurchstrahlbares Granulomer mit Pseudopodien und noch keinem oder nur wenig Hyalomer. Es konnten auch glatt begrenzte runde Zirkulationsformen nachgewiesen werden, allerdings nur ein kleiner Prozentsatz.

Anmerkung:

Polyaethensulfosäure (Na-Salz) und Dextransulfat	:	Substanzen in physiol. NaCl gelöst, 0,5 %ige Lösung
Laevansulfat und Novocain-Heparinoid	:	Substanzen hergestellt auf Vorschlag von Dr. MARX, 5 %ige Stammlösungen
Heparinoide G I und G II	:	Pectin-Derivate (Versuchs- präparate), 5 %ige Stammlösungen
"Thrombocid"	:	Depot-Thrombocid, 30 %ige Stammlösung

4) Thrombocyten unter dem Einfluss verschiedener
Sequestren-Salze.

Abbildungen 51 - 69

Testsubstanz (mg% im Blut)	Adhäsion		Evolutions- verhältnis (%)	Evolution		Aggluti- nation	BSG (mm)
	Proz. - zahl	Index- zahl		Proz. - zahl	Index- zahl		
Di-Natrium- Sequestren 15	61	IV	0/7/39/54	70	IV	+ 2-5	-
50	39	II	1/10/37/52	67	IV	++ 2-10	-
100	62	IV	11/11/46/32	41	III	+++ 2-50	-
200	1	0	(20/30/50/0)	0	0	∅	1/2
Magnesium- Sequestren 200	41	III	0/7/70/23	30	II	+ 2-3	1/2
Neodym- Sequestren 200	11	I	10/15/55/20	26	II	(+) 2-3	1/3
4-Novocain- Sequestren 500	2	0	(20/30/50/0)	0	0	∅	1/1,5

Ebenfalls eine Neodym-Verbindung ist "Thrombodym",
allerdings ohne strukturelle Ähnlichkeit mit Sequestren.
Es wird hier eigens aufgeführt:

"Thrombodym" 15	80	4	2/23/30/45	58	III	++ 2-10	-
--------------------	----	---	------------	----	-----	------------	---

ad 4) Thrombocyten unter dem Einfluss verschiedener Sequestren-Salze

Di-Na Sequestren in einer Konzentration von 15 mg% (noch keine gerinnungshemmende Wirkung) verminderte die Adhäsion der Plättchen um ein Drittel, bei Steigerung auf 50 mg% um zwei Drittel. Bei 100 mg% stieg die Klebrigkeit, offensichtlich bedingt durch starke Agglutination, wieder auf zwei Drittel an, fiel aber bei 200 mg% als Grenzkonzentration unter ein Prozent ab (Abbn 51-54). Im ganzen Präparat konnten nur wenige haftende Plättchen gefunden werden.

Die Evolutionszahl verminderte sich bei niederen Konzentrationen (15 und 50 mg%) um ein Drittel und war bei 100 mg% um die Hälfte abgesunken. Unter den wenigen bei 200 mg% noch haftenden Thrombocyten konnten keine Ausbreitungsformen II mehr beobachtet werden. Die Verteilung in die drei anderen Evolutions-Gruppen wurde mangels Masse abgeschätzt und steht daher in der Tabelle in Klammern.

Die Agglutination der Plättchen war bei der Anfangskonzentration (15 mg%) gering, verstärkte sich dann mehr und mehr (50 und 100 mg%) bis sie bei Zusatz von 200 mg% völlig verschwand.

Bei der Untersuchung des Haftpräparates (200 mg%) am Elektronenmikroskop ergab sich die Schwierigkeit überhaupt Plättchen zu finden; die wenigen beobachteten zeigten beginnende Evolution, waren aber der Zirkulationsform noch sehr nahestehend (nur kurze Pseudopodien und kleine Hyalomerzacken - Abbn 55, 56).

Hier bedingte die Sache selbst, ein Präparat mit freischwebend fixierten Thrombocyten in beliebig wählbarer Flächendichte herzustellen (Abb. 57). Bei 80% dieser Thrombocyten waren Pseudopodien bereits lichtmikroskopisch erkennbar; am Elektronenmikroskop konnten ca 10% der beobachteten Plättchen als runde oder ovale Zirkulationsformen aus glattbegrenztem, homogenem, undurchstrahlbarem Plasma identifiziert werden (Abbn 58-60).

Im Vergleich mit anderen Sequestren-Salzen bei einer Konzentration von 200 mg% lag Di-Na-Sequestren im Effekt an der Spitze (Abbn 61 - 64). Fast identische Wirkung zeigte Tetra-Novocain-Sequestren (500 mg% = 110 mg% Sequestren). Bei beiden war Adhäsion und Evolutionszahl praktisch gleich Null. Agglutination wurde nicht beobachtet. Eine Besonderheit bildeten bei Tetra-Novocain-Sequestren klebende Leukocyten (Abb 63). Bei Neodym-Sequestren lag die Klebrigkeit mit 10% immer noch niedrig, jedoch traten 25% der Plättchen als Ausbreitungsform II auf. Geringe Agglutination.

Mit Mg-Sequestren stieg Adhäsion und Evolutionszahl wieder an auf ca ein Drittel; die Agglutination war gering, aber vorhanden.

"Thrombodium" beeinflusste die Adhäsion nur geringfügig und verminderte bei mässiger Agglutination die Evolutionszahl um die Hälfte (Abb 70).

Die Werte der BSG für diese Substanzgruppe lagen gleichartig niedrig und lassen eine gewisse Stabilisierung der BSG vermuten.

Die elektronenoptische Untersuchung des Mg-Sequestren-Haftpräparates liess keine Besonderheiten erkennen. Die Verzögerung der Evolution war deutlich erkennbar, jedoch konnten Zirkulationsformen nicht mehr nachgewiesen werden (Abbn 65, 66). Die Plättchen im Neodym-Haftpräparat (Abbn 67 - 69) zeigten dichtes, pyknotisches Granulomer; auch das lappenförmig auslaufende Hyalomer erschien verdickt. Eine beobachtete Fast-Zirkulationsform (feine Pseudopodien, kleine Hyalomerzipfel) schien ebenfalls geschrumpft (Durchmesser ca 1μ).

Das "Thrombodium"-Haftpräparat ergab elektronenoptisch untersucht keine Besonderheiten, der lichtmikroskopische Befund bestätigte sich; Zirkulationsformen waren nicht nachweisbar (Abbn 71, 72).

Anmerkung:

Sequestren	: Di-amino-tetra-Essigsäure.
Di-Na-Sequestren	: 2 %ige wässrige Stammlösung (pH = 6,0) mit NaOH auf pH = 7,0 titriert. Isotonie wurde experimentell bestimmt.
Mg-Sequestren	: Versuchspräparat, 15 %ige wässrige Stammlösung.
Neodym-Sequestren	: Substanz wurde hergestellt nach Vorschlag von Dr. MARX, 1 %ige wässrige Lösung.
4-Novocain-Sequestren	: Versuchspräparat, 5 %ige Stammlösung.
"Thrombodym"	: Neodymsalz der 3-Sulfo-isonico- tinsäure, 2,5 %ige wässrige, isotone Stamm- lösung (mit 0,7% NaCl).

5) "Sequestrenoide" (Novocain und Coramin) in ihrer
Wirkung auf Thrombocyten.

Abbildungen 73 - 91

Testsubstanz (mg% im Blut)	Adhäsion		Evolutions- verhältnis (%)	Evolution		Aggluti- nation	BSG (mm)
	Proz.- zahl	Index- zahl		Proz.- zahl	Index- zahl		
Novocain 200	56	III	4/18/42/36	46	III	+ 2-5	-
400	19	I	8/35/49/3	8	I	∅	-
Novocain 15 + Na-Citr. 400	27	II	0/13/51/38	49	III	(+) 2-3	1/4
+ dto. 150	22	II	0/4/69/27	35	II	(+) 2-3	1/3
+ dto. 200	7	I	(20/30/50/0)	0	0	∅	1/2
+ dto. 400	6	I	(30/30/40/0)	0	0	∅	0/0, 5
Coramin 15 + Citr. 400	28	II	2/12/46/40	51	III	(+) 2-3	2/6
+ dto. 200	28	II	5/22/52/21	27	II	(+) 2-3	-
+ dto. 400	8	I	(10/30/60/0)	0	0	∅	-

ad 5) "Sequestrenoide" (Novocain und Coramin) in ihrer Wirkung auf Thrombocyten

Obwohl Novocain keine gerinnungshemmende Wirkung hat, zeigte es Thrombocyten gegenüber **Wirksamkeit**.

Bei einer Konzentration von 200 mg% war Klebrigkeit und Evolutionszahl auf die Hälfte abgesunken, Verdoppelung der Konzentration verstärkte den Effekt auf 20% Adhäsion und Evolutionszahl von 10% (Abbn 73, 74).

Die vorher bestehende merkliche Agglutination verschwand.

Um die Gerinnung auszuschalten wurde neben Novocain noch Na-Citrat (400 mg%) zugesetzt:

Bei einer Novocain-Konzentration von 15 mg% zeigte sich lediglich der Na-Citrat-Effekt (Klebrigkeit auf ein Viertel, Evolutionszahl auf die Hälfte vermindert, geringe Agglutination), der auch bei 150 mg% Novocain nur unwesentlich niedriger war. Erst bei einer Grenzkonzentration von 200 mg% fiel die Adhäsion unter 10% ab und Ausbreitungsform Ultrar nicht mehr auf, Agglutination war nicht mehr zu beobachten. Eine Verdoppelung der Konzentration auf 400 mg% verstärkte den Effekt nur kaum merklich (Abbn 75 - 78).

Novocain in hoher Konzentration (200 mg% und mehr) schien die BSG zu stabilisieren.

Coramin mit Na-Citrat-Zusatz ergab im wesentlichen das gleiche Bild, nur lag die Grenzkonzentration um ca 100 mg% höher (Abbn 88 - 91).

Wegen der geringen Zahl klebender Plättchen war es nötig, freischwebend fixierte Thrombocyten zu untersuchen (Abb 79). Lichtoptisch waren bei 25% dieser Plättchen (Novocain 200 mg% + Na-Citrat 400 mg%) keine Pseudopodien zu erkennen. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten ca 20% Zirkulationsformen bestätigen (Abbn 80 - 84). Ein Teil der Plättchen hatte zwar noch glatt begrenztes Plasma, zeigte jedoch Quellungs- und Entmischungserscheinungen im Plasma als Zeichen beginnender Evolution. Teilweise aber waren die beobachteten Zirkulationsformen

mit sofort nach Blutentnahme fixierten Nativblut-Zirkulationsformen (Abb 85) morphologisch völlig identisch.

Um zu prüfen, ob diese morphologische Identität nicht einfach regelrechte Fixierung der Thrombocyten durch Novocain als Ursache hat, wurde methodisch so vorgegangen:

Das für die Fixierung freischwebender Plättchen bestimmte thrombocytenhaltige Plasma wurde aufgeteilt. Der eine Teil wurde mit Fixierungsflüssigkeit versetzt, der andere Teil mit phys. Kochsalzlösung, der (zur Gerinnungshemmung) Na-Citrat zugesetzt war (400 mg%). Bei dem in der angegebenen Art folgenden Waschen wurden die fixierten Plättchen mit aqua dest., die unfixierten, Novocain-haltigen, mit der angegebenen Flüssigkeit nachgewaschen. Die jeweils letzte Suspension ergab einmal in üblicher Weise behandelt ein Präparat freischwebend fixierter Plättchen (Abb 87), im anderen Fall als Haftpräparat weiter behandelt (siehe Methodik) und insgesamt 120 min nach Blutentnahme fixiert das gewünschte Testpräparat (Abb 86).

Die Untersuchung dieses Präparates liess erkennen, dass die Thrombocyten fast durchweg lange, kräftige Pseudopodien ausgebildet hatten; Hyalomer war bei einem Grossteil der Plättchen vorhanden, doch nur als Ausbreitungsform I.

Eine fixierende Wirkung des Novocain ist nach diesem Befund nicht anzunehmen.

Das Verhalten von Thrombocyten bei angeborener Thrombasthenie

NAEGELI als Vergleich.

Abbildungen 92 und 93

Haftpräparat von	Adhäsion		Evolutions- verhältnis (%)	Evolution		Aggluti- nation	BSG (mm)
	Proz.- zahl	Index- zahl		Proz.- zahl	Index- zahl		
Normalblut mit Zusatz von 400 mg% Citrat	26	II	0/19/42/39	50	III	(+) 2-3	1/4
Pathol. Blut mit Zus. von 400 mg% Citr.	15	I	7/31/62/0	0	0	Ø	20/43

Besonderheit: Klebenbleiben von Leukocyten auf der Zaponfolie.

Das pathologische Blut stammt von einer Patientin, die hereditär mit hämorrhagischer Diathese belastet ist. Die Diagnose Thrombasthenie NAEGELI wurde klinisch bereits vor längerer Zeit gestellt.

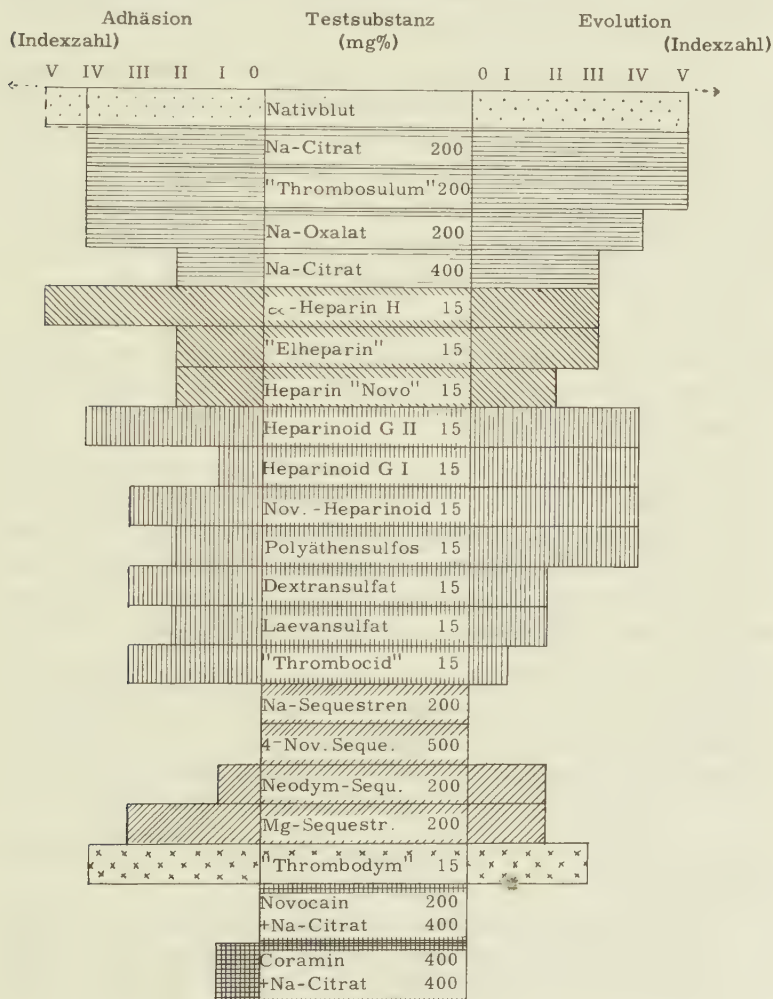
Die funktionelle Asthenie dieser Thrombocyten konnte im Versuch bestätigt werden. Unter Berücksichtigung der Wirkung des Citrat-Zusatzes (zur Gerinnungshemmung) zeigte sich, dass die Adhäsion der pathologischen Plättchen um die Hälfte geringer war als bei Normalblut-Thrombocyten.

Auch die Evolution war sehr mangelhaft. Plättchen im Stadium der Ausbreitungsform II konnten nicht beobachtet werden (45 min nach Blutentnahme fixiert), während im Versuch mit Normalblut die Hälfte der Thrombocyten dieses Stadium erreicht hatte. Agglutination trat nicht auf.

Am Elektronenmikroskop zeigte sich, dass die Plättchen zwar meist kräftige Pseudopodien entwickelt hatten, das Hyalomer aber nur spärlich oder überhaupt nicht ausgebildet war. Einige Plättchen wurden beobachtet, die der Zirkulationsform noch sehr nahe standen.

ZUSAMMENFASSUNG

Der besseren Übersicht wegen sind die wichtigsten Versuchsergebnisse als Diagramm zusammengefasst.



Das vorstehende Diagramm zeigt den Einfluss der untersuchten Pharmaka auf das funktionsmorphologische Verhalten normaler Thrombocyten unter den beschriebenen Versuchsbedingungen. Die Übereinstimmung in bestimmten Punkten und das im ganzen aber recht unterschiedliche Ausfallen der Ergebnisse lässt erkennen, dass die Methodik für vergleichende Untersuchungen hinreichend genau war.

Zusammenfassend beurteilt ergibt sich für die untersuchten Substanzgruppen: Die Citrat-Gruppe ist bei einer Vergleichskonzentration von 200 mg% einheitlich wirksam und das Verhalten der Thrombocyten weicht unter ihrem Einfluss nur wenig von der Nativblutnorm ab.

Na-Citrat in kliniküblicher Konzentration (400-800 mg%) vermindert die Adhäsion bei geringer Agglutination auf ein Viertel der Norm, die Evolution jedoch läuft nur zeitlich geringfügig verzögert ab.

Unterschiedlich ist die Wirkung von Heparinen. Der Maximal-Effekt (bei Heparin Novo) besteht in einer Verminderung der Klebrigkeit auf ein Drittel, deutlicher Agglutinationsneigung und eindeutiger Evolutionsverzögerung.

Heparinoide sind bis auf die gemeinsame geringe Neigung zu Agglutination in ihrer Wirksamkeit noch unterschiedlicher und uneinheitlicher. Hier ist einerseits starke Klebrigkeitsverminderung (auf 20%) ohne wesentliche Beeinflussung der Evolution zu beobachten (Heparinoid G I) andererseits deutliche Evolutionshemmung mit nachweisbaren Zirkulationsformen, wobei die Adhäsion nur um 50% herabgesetzt ist ("Thrombocid").

Verschiedenartige Sequestren-Salze verhalten sich völlig different. Na-Sequestren hebt, in einer Grenzkonzentration von 200 mg% zugesetzt, Adhäsion und Agglutination praktisch auf und hemmt die Evolution so nachhaltig, dass 10% der Thrombocyten noch als Zirkulationsform vorliegen und Ausbreitungsform II nicht mehr auftritt.

Bei Austausch der Natrium-Atome gegen Magnesium lässt der Effekt stark nach und nähert sich der Citrat-Wirkung.

Mit Novocain und Coramin (Substanzen, die dem Sequestren strukturell teilweise ähnlich sind =Sequestrenoide) kann der Na-Sequestren-Effekt ebenfalls erreicht werden; allerdings bei höheren Konzentrationen oder

bei durch Citrat-Zusatz potenziierter Wirkung. Novocain (200 mg%) mit Citratzusatz hemmt die Evolution sogar noch nachhaltiger (20% Zirkulationsformen).

Das Verhalten pathologischer Thrombocyten bei Thrombasthenie NAEGELI zeigt Ähnlichkeit mit dem normaler Plättchen unter der Wirkung von Na-Sequestren.

DISKUSSION

Überblickt man die Untersuchungsergebnisse, so ist das Abweichen der Thrombocyten von ihrer funktionsmorphologischen Reaktionsnorm unter dem Einfluss verschiedener Pharmaka deutlich erkennbar.

Ebenfalls zeigt sich, dass Adhäsion, Agglutination und Evolution unabhängig von einander auftretende Phänomene sind. Dies schließt nicht aus, dass sie in toto durch ein einziges Pharmakon (beispielsweise Na-Sequestren) beeinflusst werden können. Allerdings lässt die Vielzahl der Möglichkeiten nicht übersehen, welches die wirksamen Komponenten des Pharmakons sind. Einerseits scheint die strukturelle Konfiguration (Sequestren und Novocain), andererseits die definierte Besetzung von Nebenvalezen (Natrium- oder Magnesium-Sequestren) eine Rolle zu spielen.

Wo der Angriffspunkt am Thrombocyten liegt, ist unbekannt. Die teilweise schlagartig ansteigende Wirkung mancher Substanzen bei einer bestimmten Grenzkonzentration lässt einen quantitativ stöchiometrischen Wirkungsmechanismus vermuten.

Weitere Untersuchungen bedarf es, um die Berechtigung zu funktionsmorphologischer Betrachtungsweise zumindest innerhalb gewisser Grenzen zu bestätigen. Bei Thrombocyten, die morphologisch Auflösungserscheinungen zeigen, ist der Analogieschluss auf irreversibel veränderten Funktionszustand zweifellos richtig. Fraglich aber ist, ob eine pharmakologisch erzielte Verminderung oder Aufhebung von Adhäsion, Agglutination und Hemmung der Evolution - selbst bei morphologischer Identität mit dem intravasalen Zustand - eine reversible Stabilisierung des Funktionszustandes, den die Thrombocyten in der Blutbahn haben, bedeutet.

Es besteht die Möglichkeit, dass ein beobachteter pharmakologischer Effekt nur kurzfristige Stabilisierung (bei Na-Citrat wurde dies für die Evolution bewiesen) oder sogar irreversible Schädigung im Sinne einer Fixierung darstellt (bei der Prüfung der Novocain-Wirkung ist diese Frage bereits angeschnitten worden).

Nötig sind solche Untersuchungen aber nur für Substanzen, deren beobachteter Effekt vermuten lässt, dass wenigstens angenähert ideale Wirkung erreicht ist:

Thrombocyten vom Augenblick der Blutentnahme an in einen, als "Funktionsnarkose" bezeichnenbaren Zustand zu versetzen, der solange anhält, bis die Plättchen sich wieder in gewohntem Milieu - nämlich in einem Blutgefäß - befinden.

Damit wäre das Problem der Übertragung voll funktionsfähiger Thrombocyten, beispielsweise bei Thrombopenie, der Lösung nahe gebracht. Selbstverständlich müsste noch im Tierversuch geprüft werden, ob das mit dem "Erwachen" der Thrombocyten ins Plasma diffundierende Pharmakon im Organismus keine Nebenwirkungen verursacht und ob es vollständig ausgeschieden wird.

TEIL II (Abbildungen)

Alle am Phasenkontrastmikroskop aufgenommenen Fotos haben eine Gesamtvergrößerung von 480-fach. Sie wurde an einer Masstabs-Aufnahme ausgemessen: Die Kantenlänge eines kleinen Quadrates der abgebildeten Neubauer-Zählkammer beträgt 0,05 mm und ist auf 240 mm vergrößert. Es ergibt sich daraus eine Gesamtvergrößerung von linear 480-fach. Sie wird bei allen Aufnahmen dieser Art nicht mehr eigens angegeben.

Bei allen elektronenoptischen Aufnahmen ist die jeweilige Vergrößerung der Abbildung vermerkt.

Abbildung 85 (Nativblut-Thrombocyt, Zirkulationsform) wurde für diese Arbeit freundlicherweise von Herrn Dr. KÖPPEL zur Verfügung gestellt.

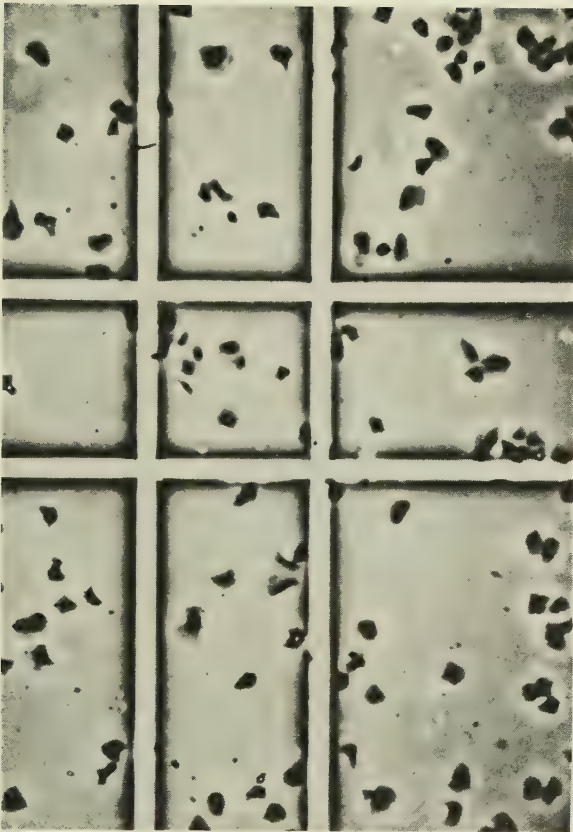


Abb. 2: Masstabsaufnahme.
Thrombocyten (nach Na-Citrat-
Einwirkung) auf einer nach Vor-
schlag von Dr. MARX mit Zapon-
folie belegten Neubauer-Zählkam-
mer (Haftpräparat).





Abb. 5

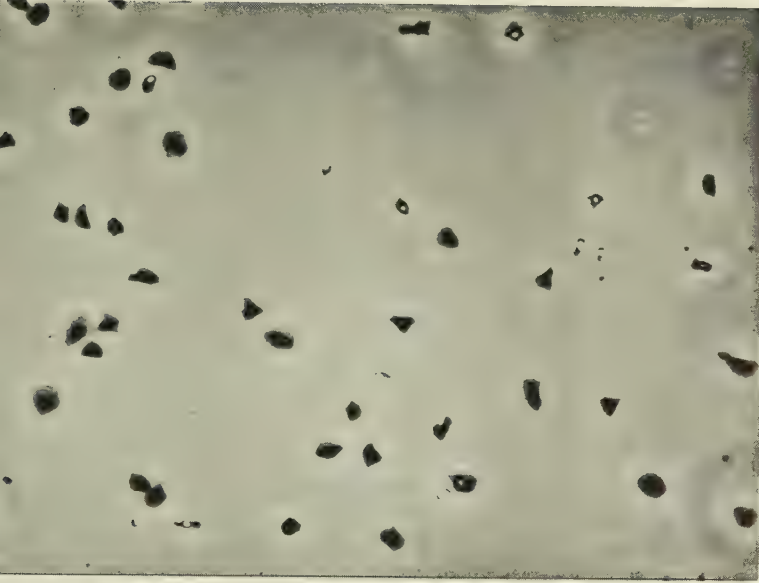
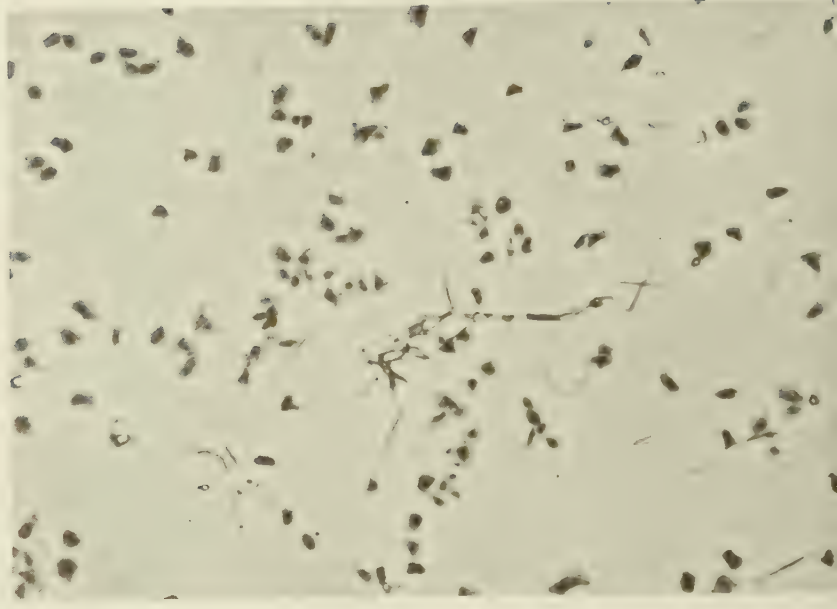
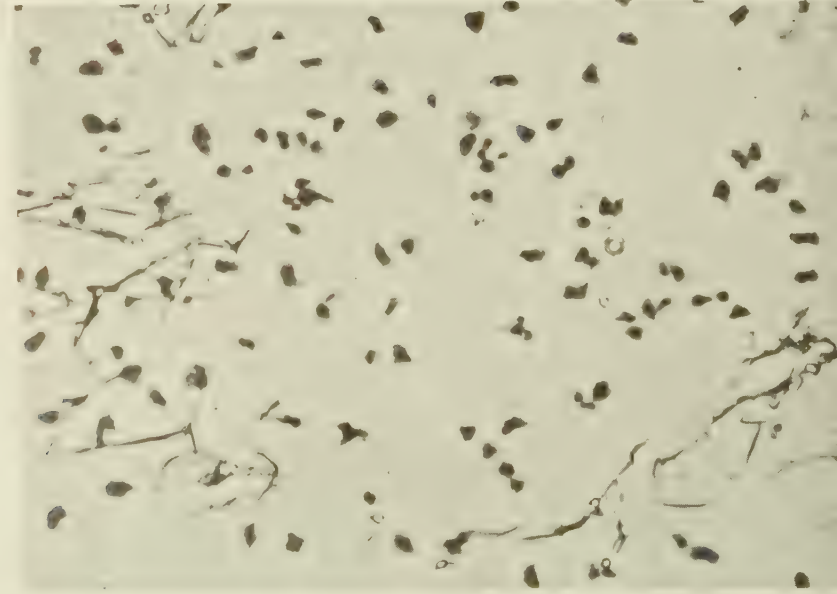


Abb. 6

Thrombocyten nach Na-Citrat-Einwirkung (400 mg%) bei stark erhöhter BSG (96/116) 30, 60 und 120 min nach Aufbringen auf die Testfläche fixiert (Abb. 3-5) im Vergleich zum Normalblut-Versuch (nach 30 min fixiert - Abb. 6).

Das Verhalten von Nativblut-Thrombocyten und ihre
Beeinflussung durch Na-Citrat.



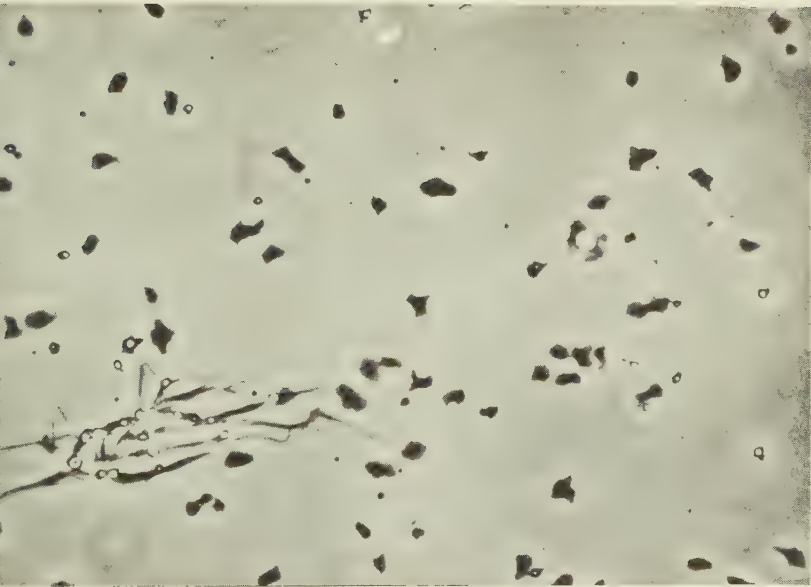


Abb. 9: Na-Citrat
50 mg%

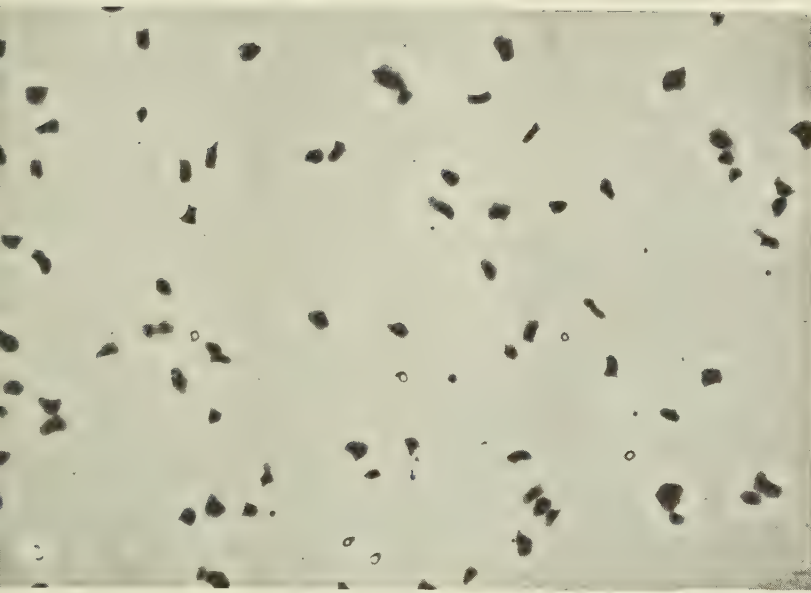


Abb. 10: Na-Citrat
100 mg%

Beeinflussung der Thrombocyten durch Na-Citrat.





Abb. 13: Na-Citrat
800 mg%

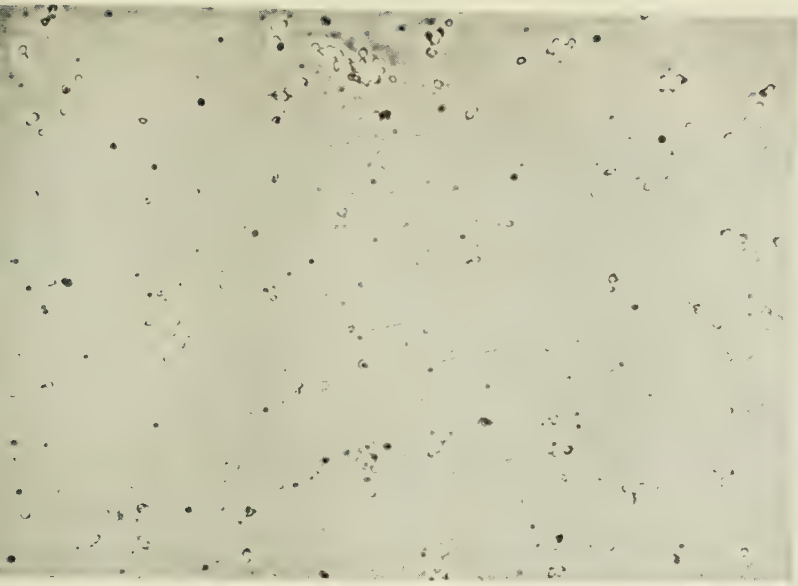


Abb. 14: Na-Citrat 400 mg%,
Thrombocyten freischwebend
fixiert.

Beeinflussung der Thrombocyten durch Na-Citrat.

Haftpräparat (400 mg%)



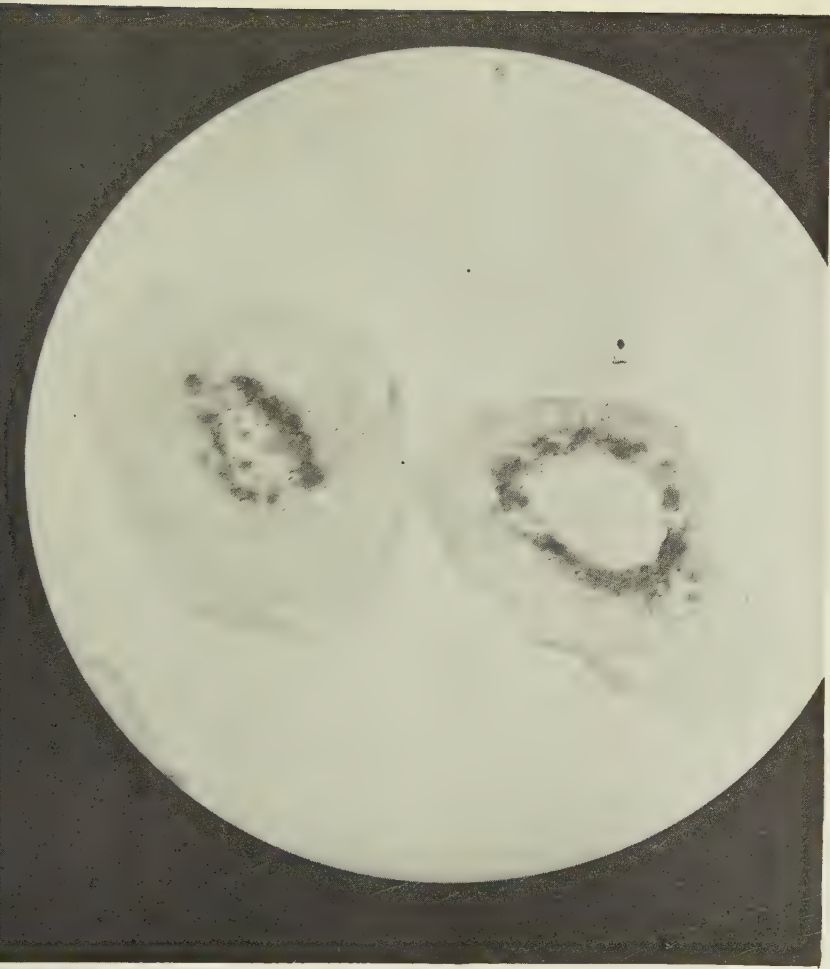


Abb. 16: Vergr. 3800 x 2

Beeinflussung der Thrombocyten durch Na-Citrat.
Haftpräparat (400 mg%)



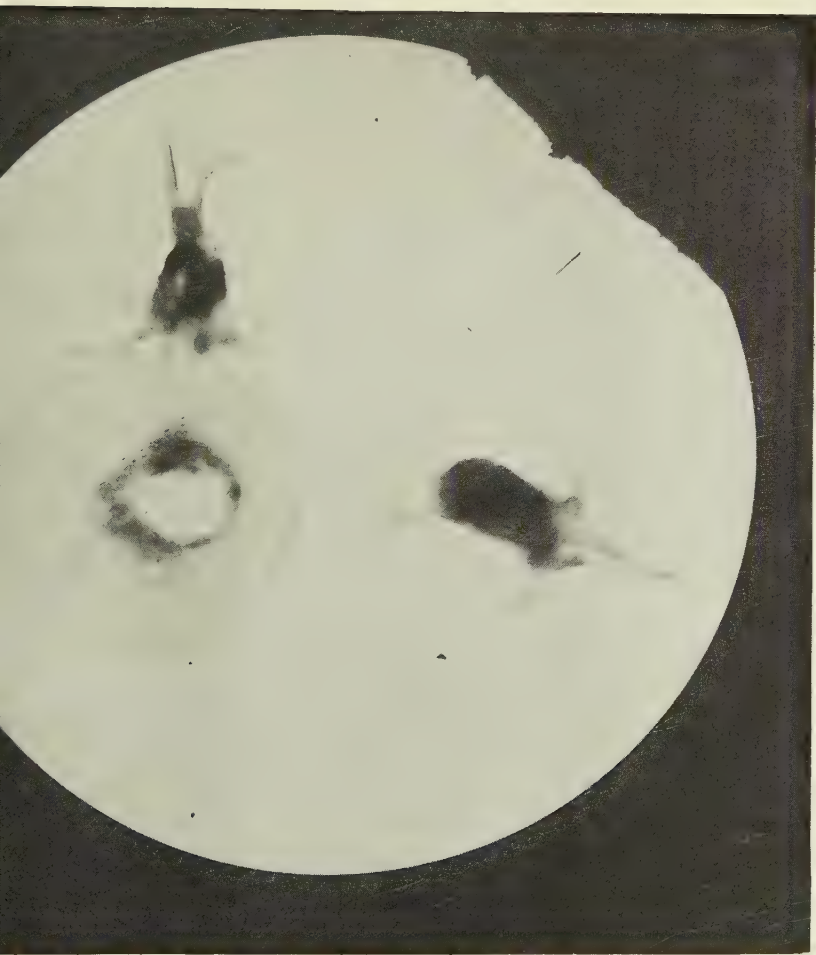


Abb. 18: Vergr. 3800 x 2

Beeinflussung der Thrombocyten durch Na-Citrat.
Plättchen freischwebend fixiert (400 mg%)



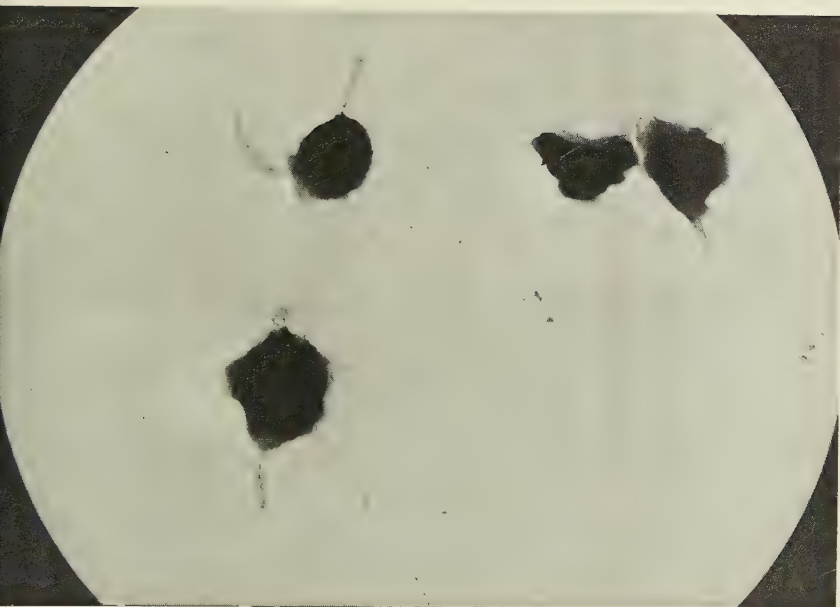


Abb. 20: Vergr. 3800 x 2

Thrombocyten unter dem Einfluss von Na-Citrat, Na-Oxalat
und "Thrombosolum" in gleicher Konzentration.



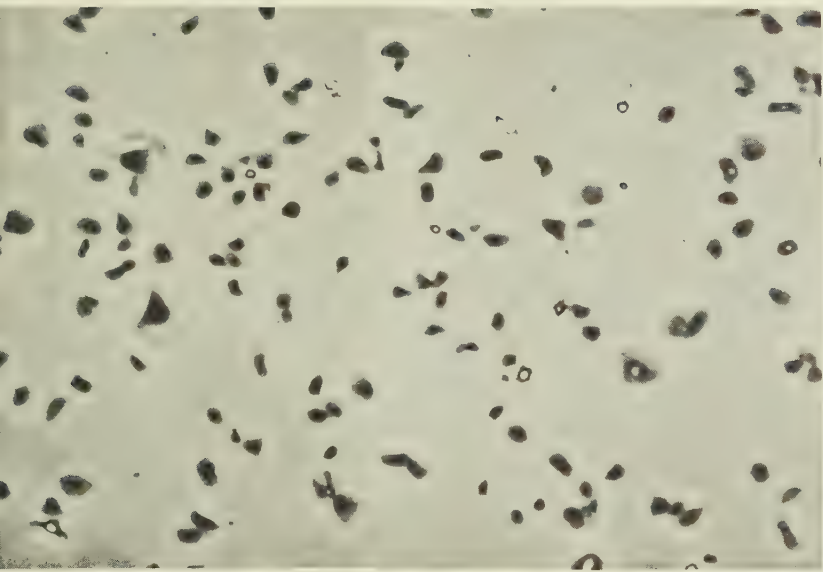


Abb. 23: "Thrombosolum"
200 mg%

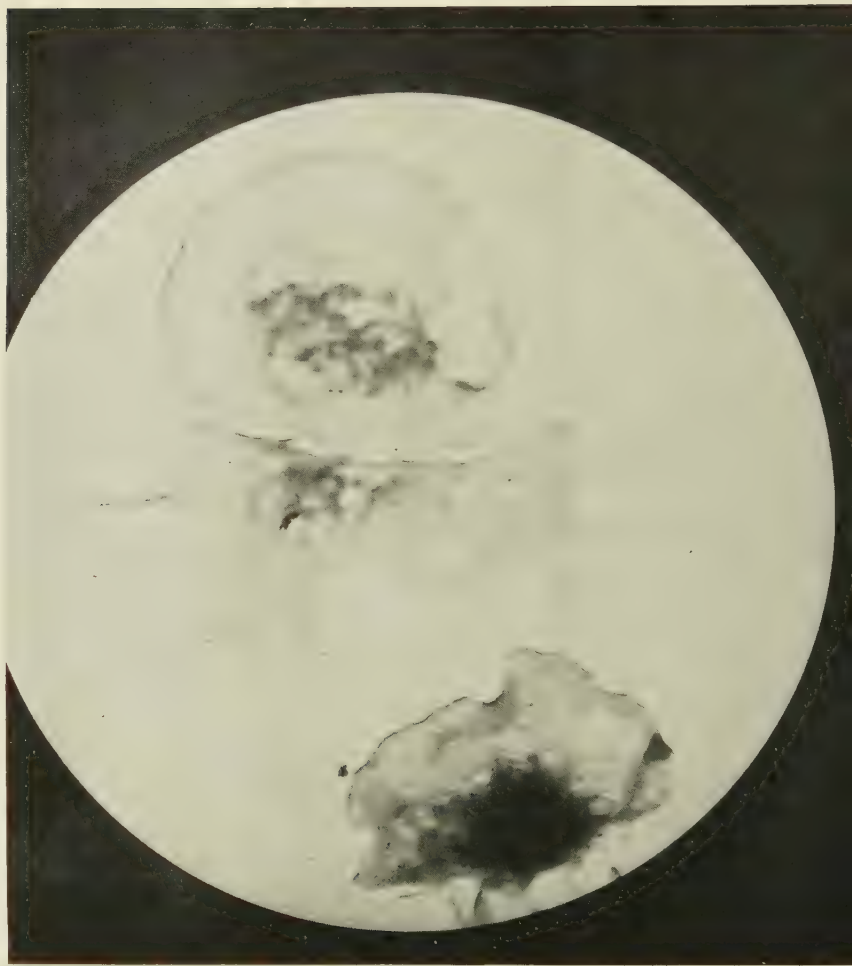
Beeinflussung der Thrombocyten durch Na-Oxalat.
Haftpräparat (200 mg%)





Abb. 25: Vergr. 3800 x 2

Beeinflussung der Thrombocyten durch Na-Oxalat.
Haftpräparat (200 mg%)



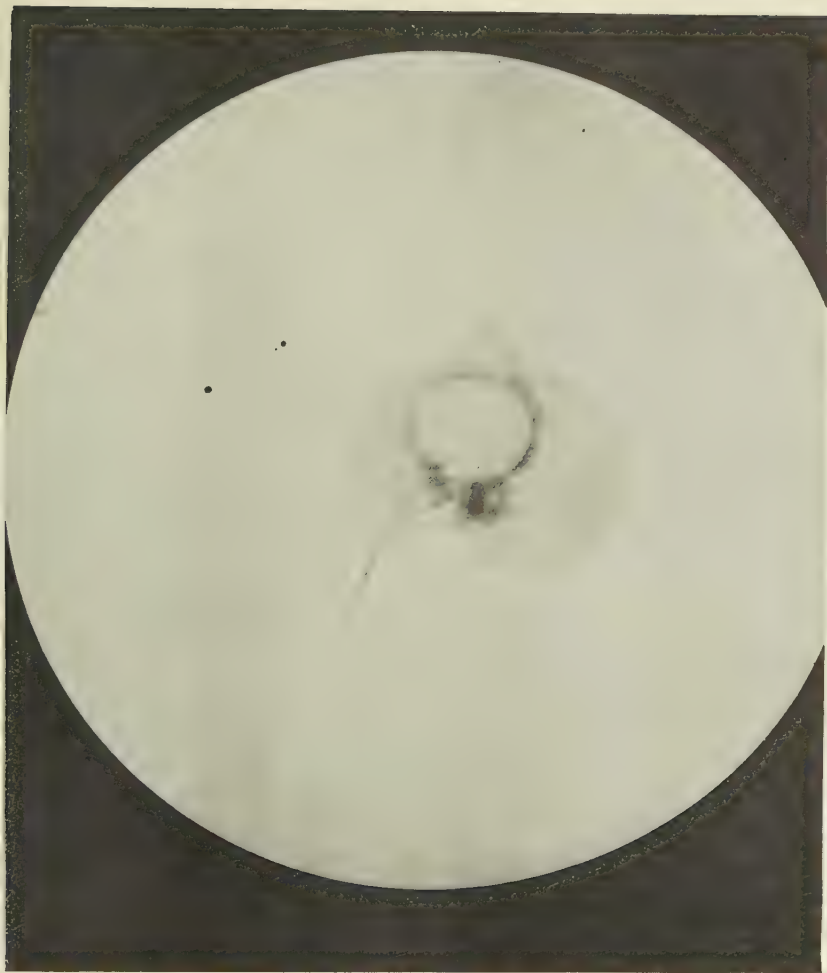


Abb. 27: Vergr. 3800 x 2

Beeinflussung der Thrombocyten durch "Thrombosolum".
Haftpräparat (200 mg%)



Abb. 28: Vergr. 1000 x 2

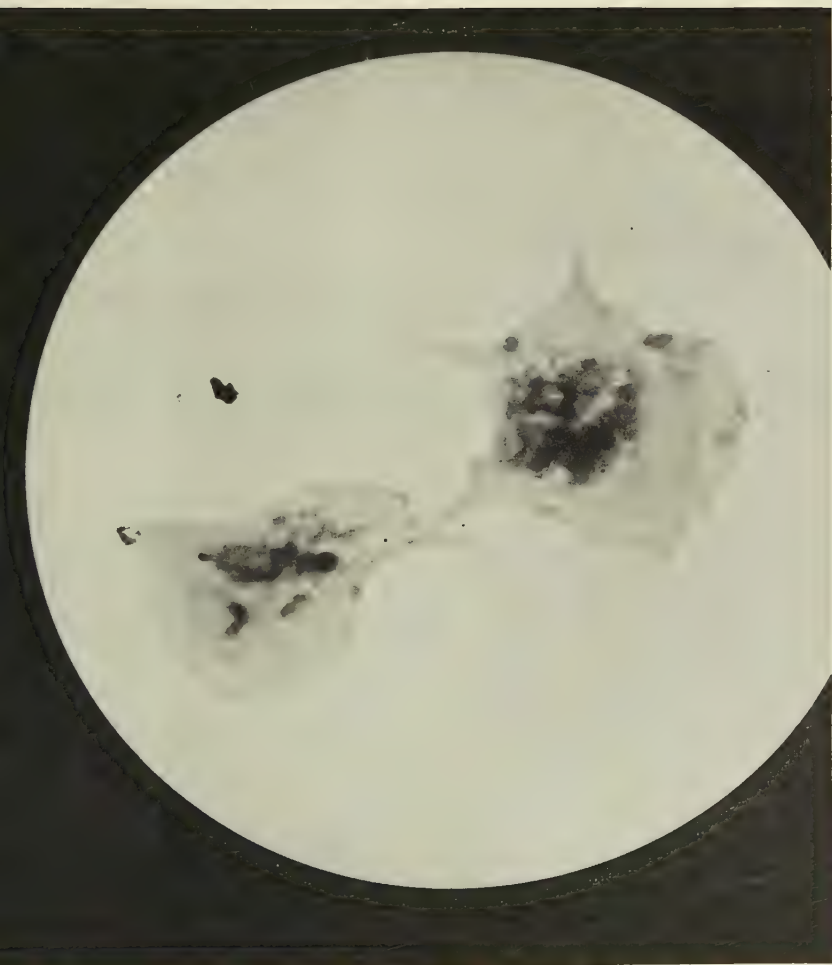
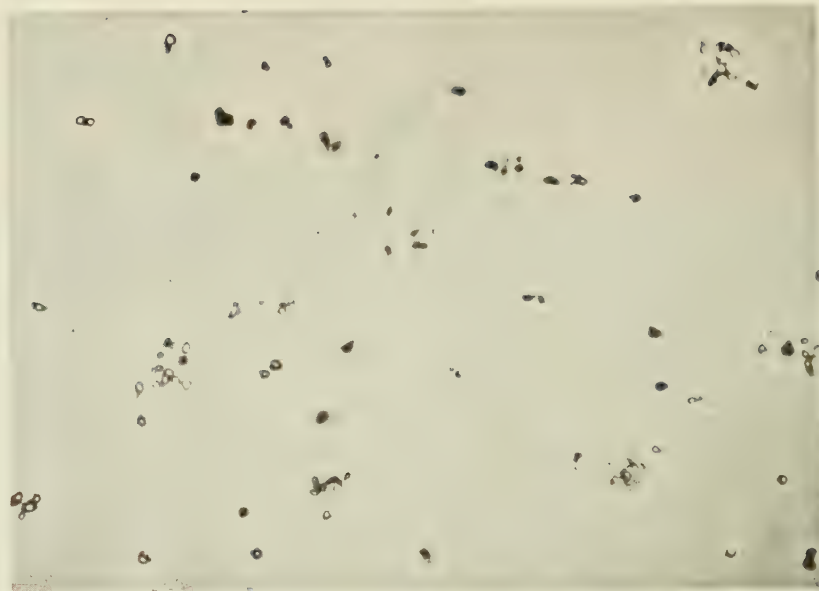


Abb. 29: Vergr. 3800 x 2

Die Wirksamkeit verschiedener Heparine auf Thrombocyten.
Konzentrationspektrum für α -Heparin "Novo" (15-200 mg%)



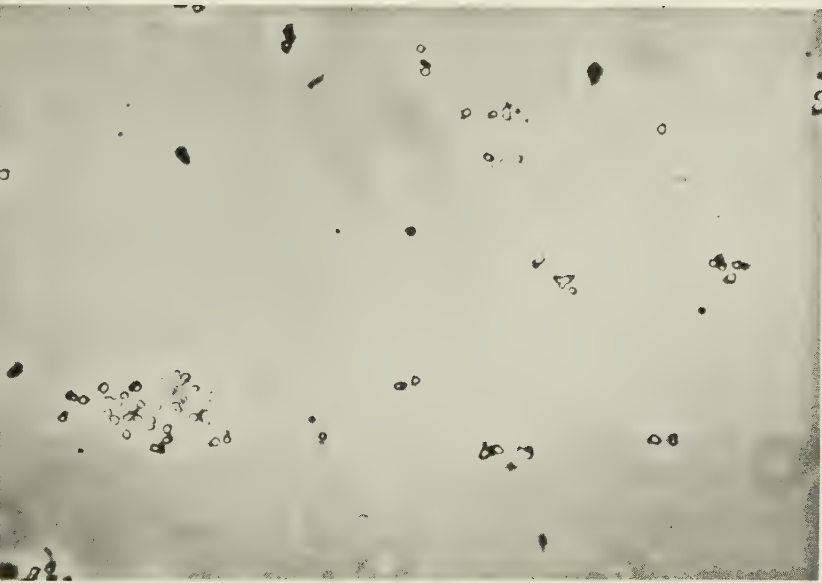


Abb. 32: α -Heparin "Novo" 100 mg%

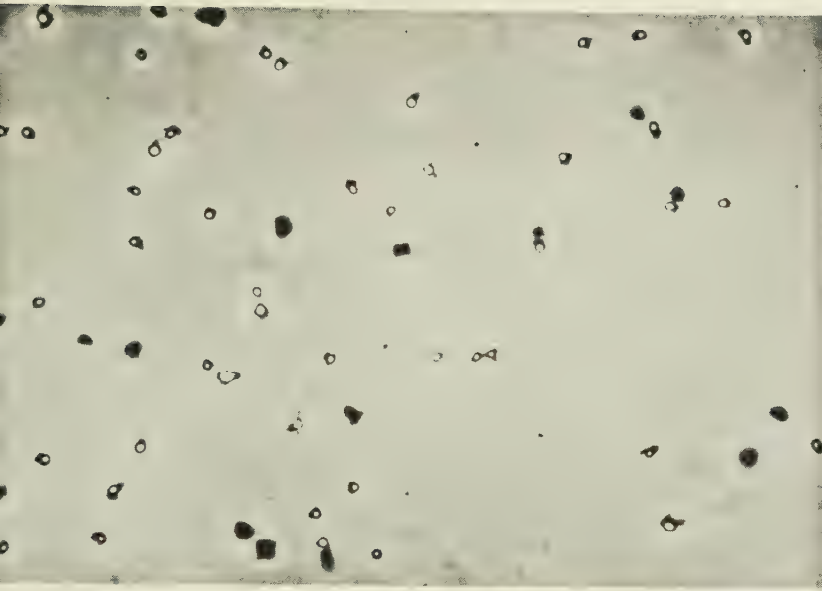


Abb. 33: α -Heparin "Novo" 200 mg%

Die Wirksamkeit verschiedener Heparine in gleicher Konzentration.

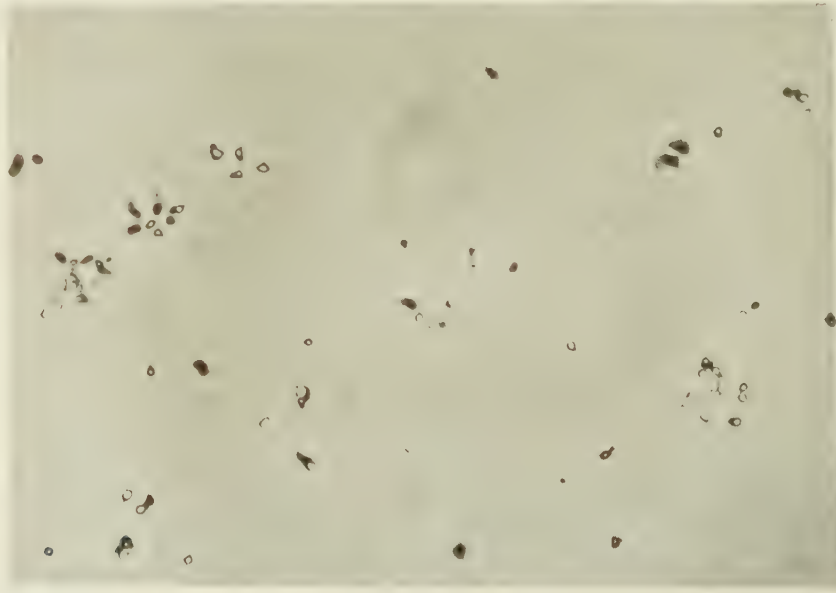


Abb. 34: α -Heparin "Novo"
15 mg%

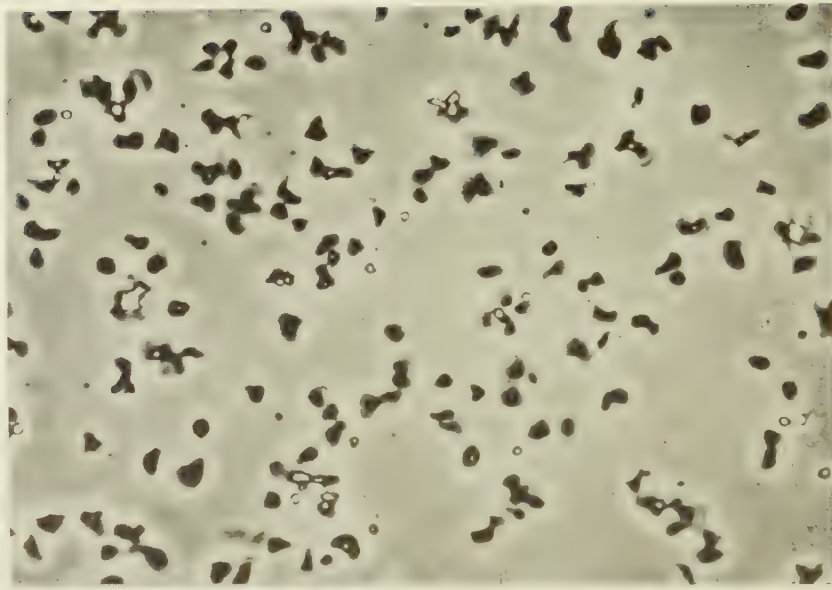


Abb. 35: α -Heparin H
15 mg%

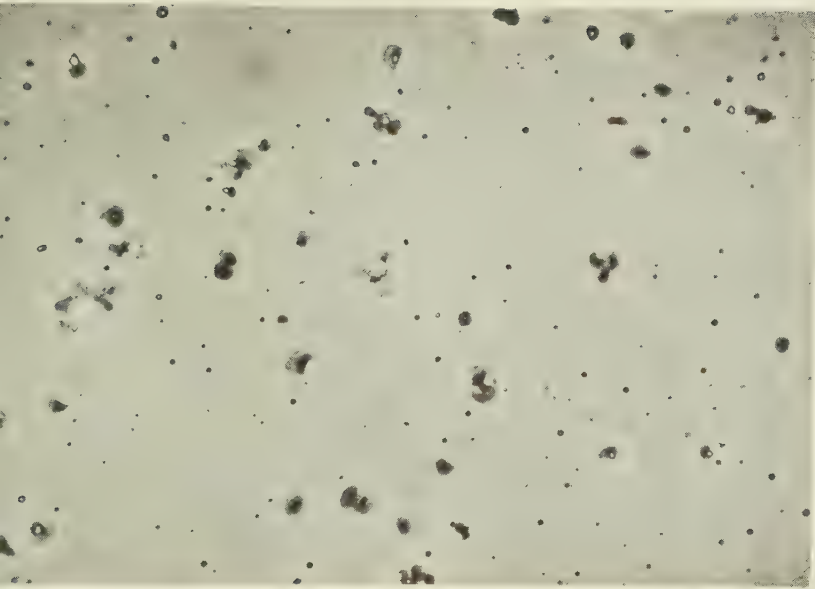


Abb. 36: "Elheparin"
15 mg%

Die Wirksamkeit von Heparin "Novo" auf Thrombocyten.
Haftpräparat (15 mg%)



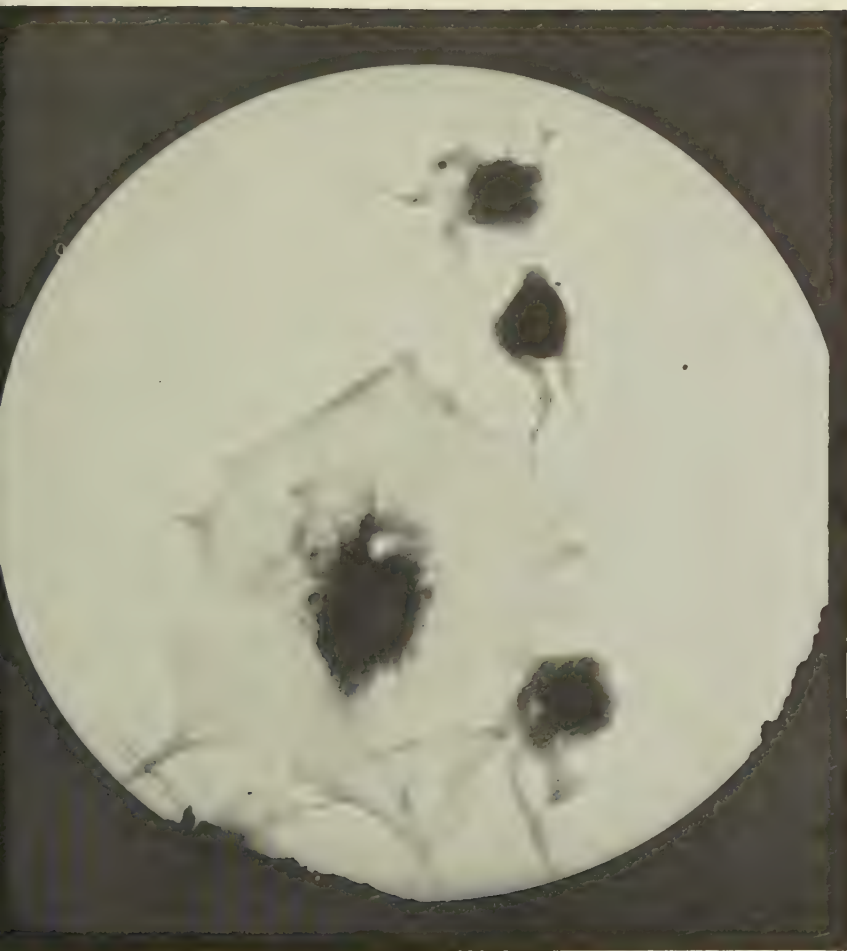


Abb. 38: Vergr. 3800 x 2

Die Wirksamkeit von Heparin "Novo" auf Thrombocyten.
Haftpräparat (15 mg%)

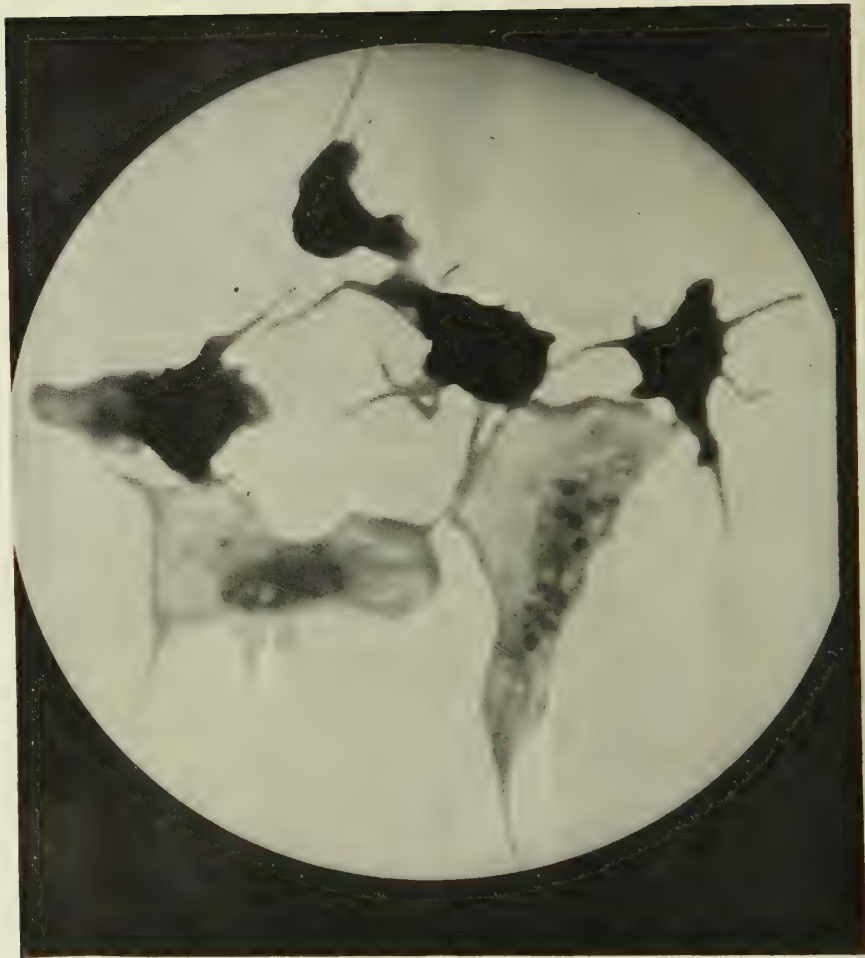




Abb. 40: Vergr. 3800 x 2

Thrombocyten unter dem Einfluss verschiedener Heparinoide.

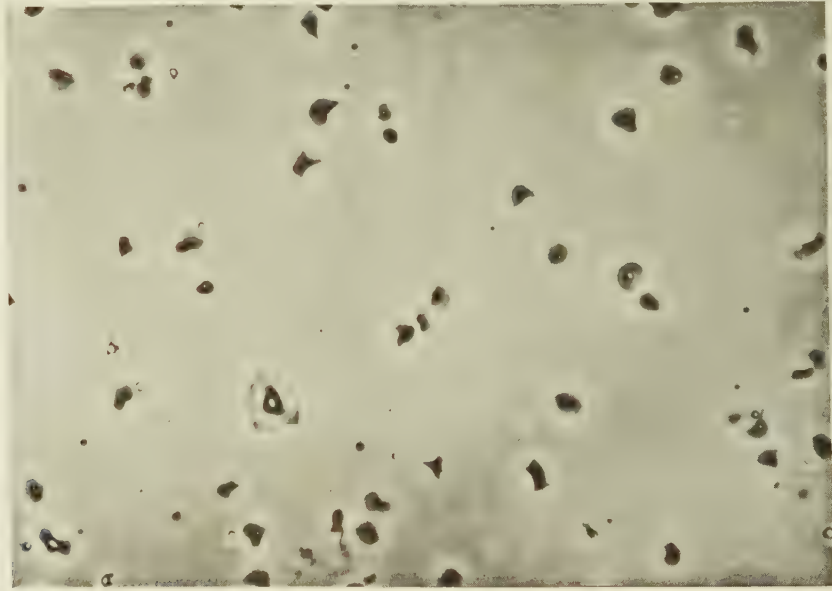


Abb. 41: Polyäthensulfosäure

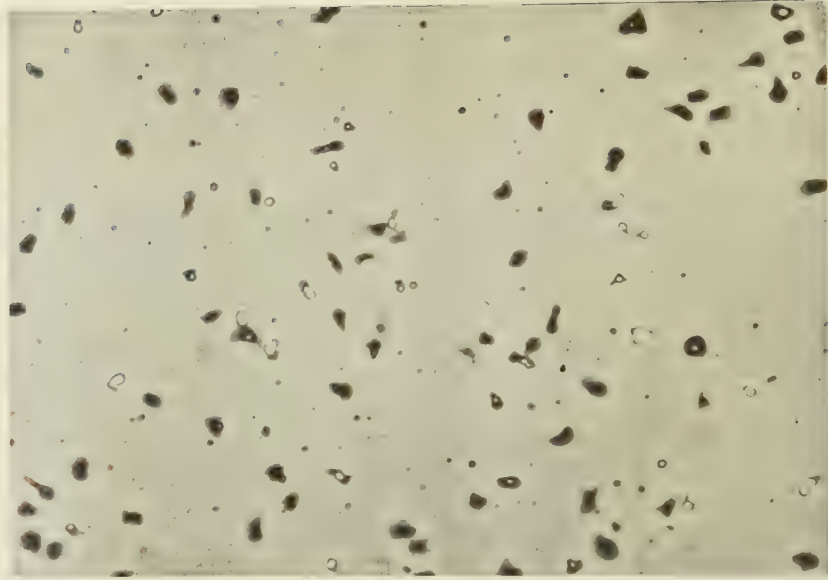


Abb. 42: Dextransulfat

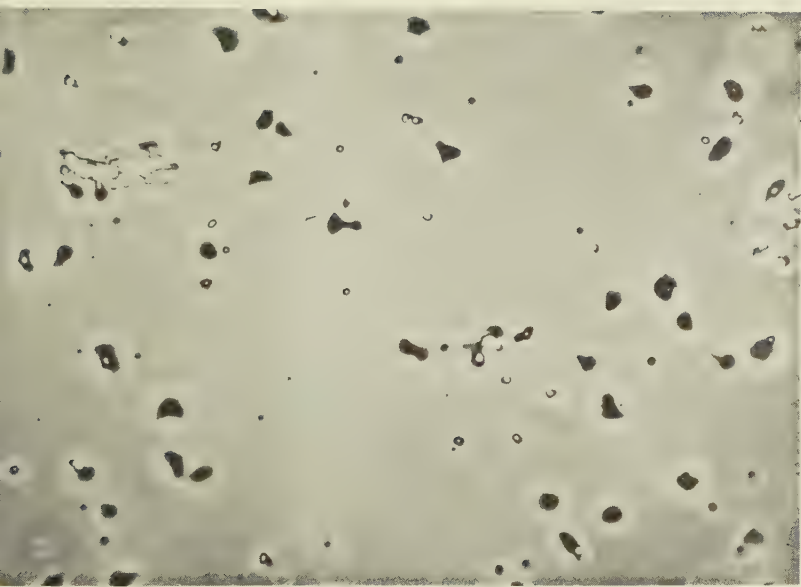


Abb. 43: Laevansulfat
15 mg%

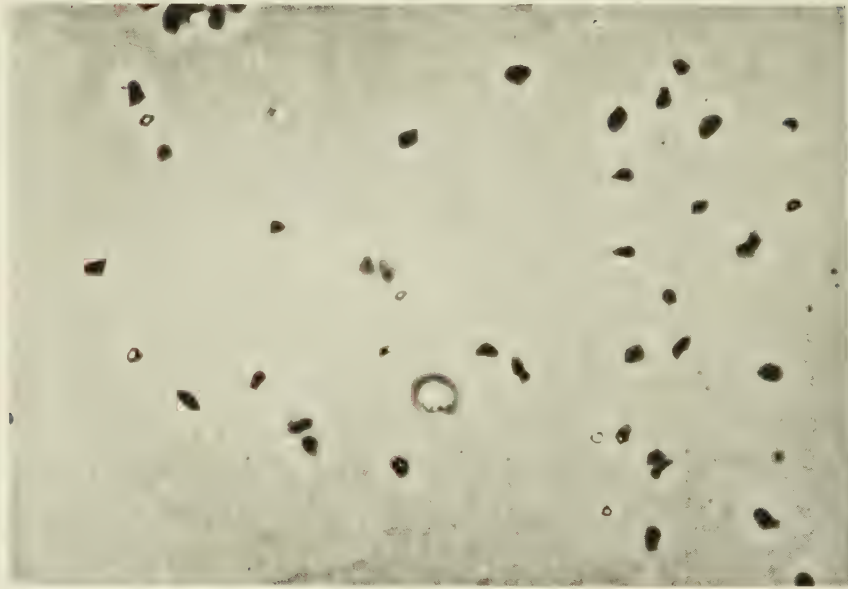


Abb. 44: Heparinoid G I
15 mg%

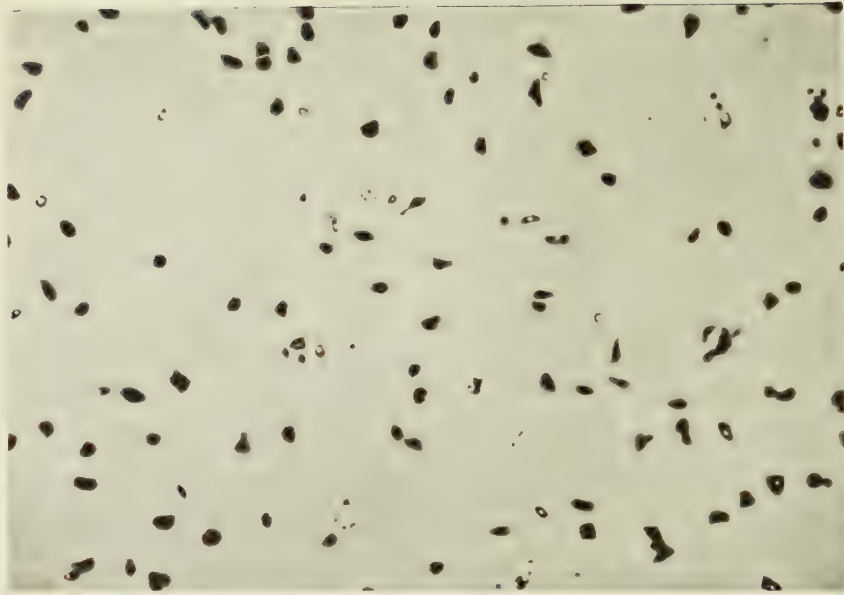


Abb. 45: Heparinoid G II
15 mg%

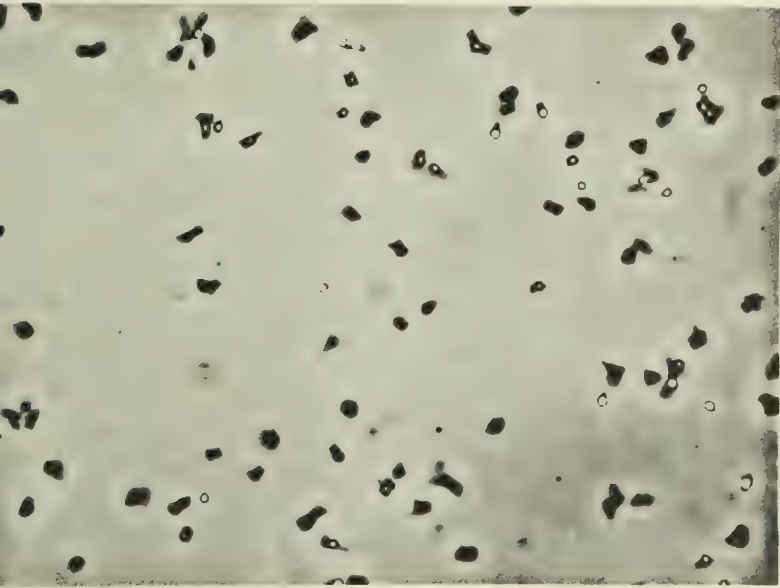


Abb. 46: Novocain-Heparinoid
15 mg%

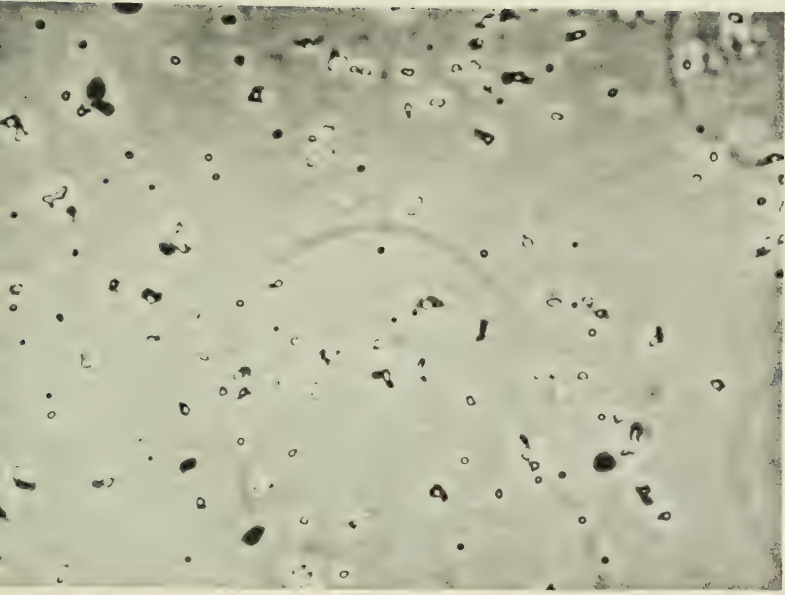
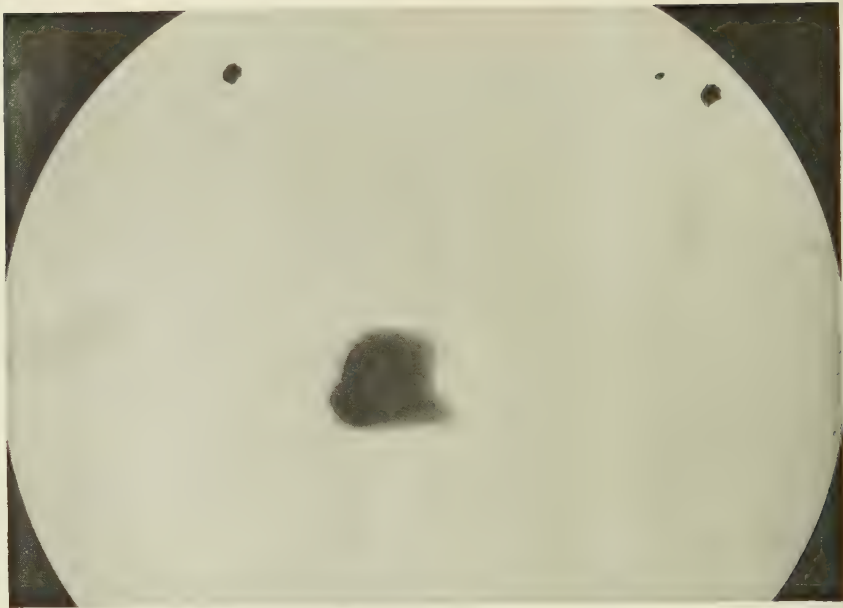


Abb. 47: Thrombocid
15 mg%

Thrombocyten unter dem Einfluss verschiedener Heparinoide.
Thrombocid (15 mg%), Haftpräparat



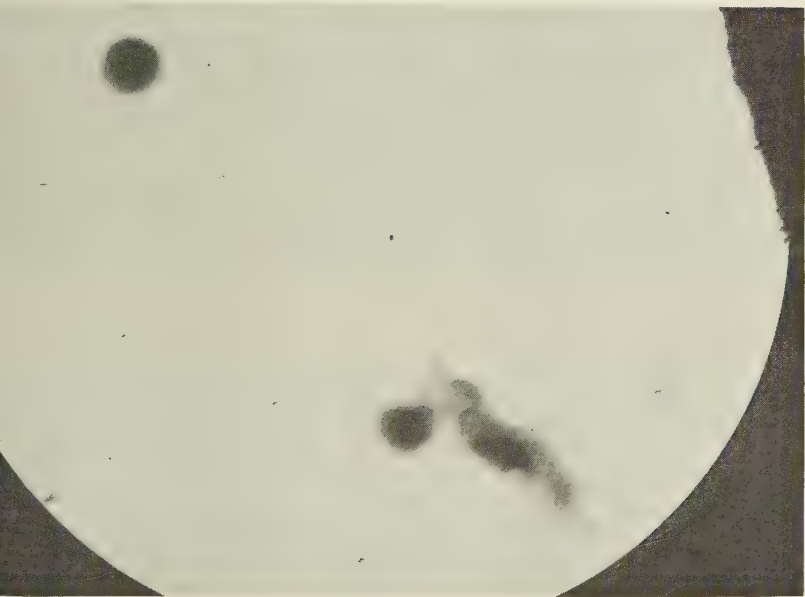
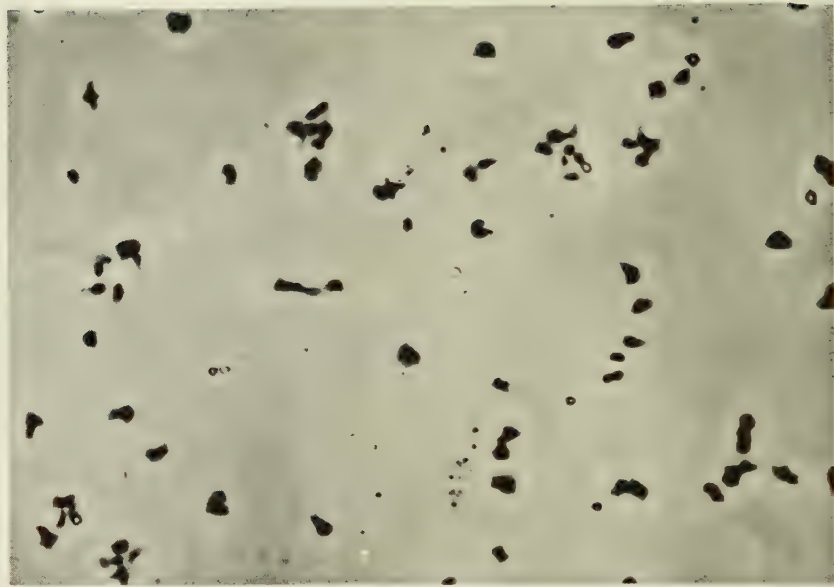


Abb. 50; Vergr. 3800 x 2

Die Wirkung von Sequestren auf Thrombocyten.
Konzentrations-Spektrum für Di-Na-Sequestren (15-200 mg%)



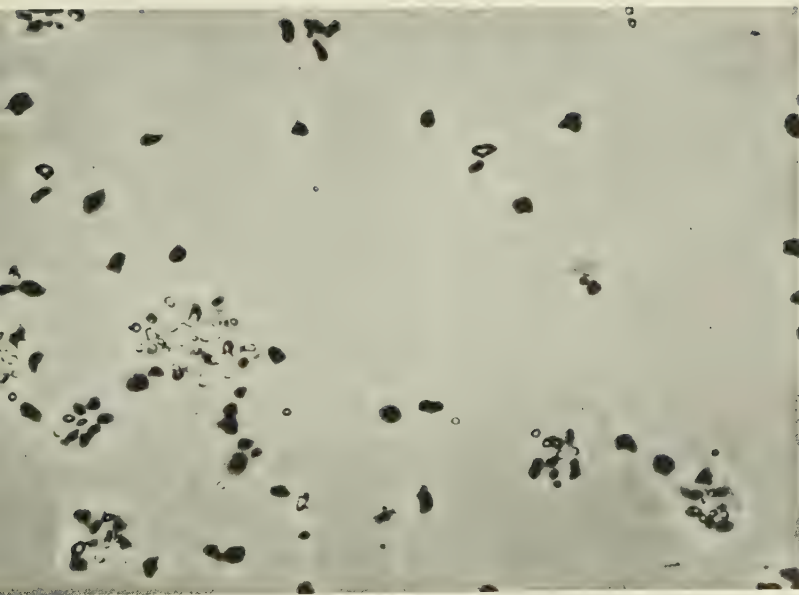


Abb. 53: Di-Na-Sequestren
100 mg%

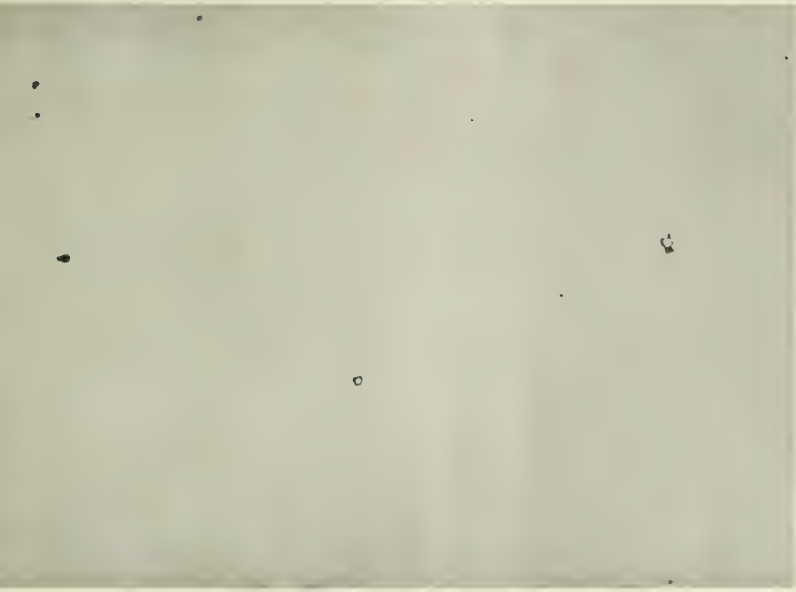


Abb. 54: Di-Na-Sequestren
200 mg%

Die Wirkung von Sequestren auf Thrombocyten.
Di-Na-Sequestren (200 mg%)

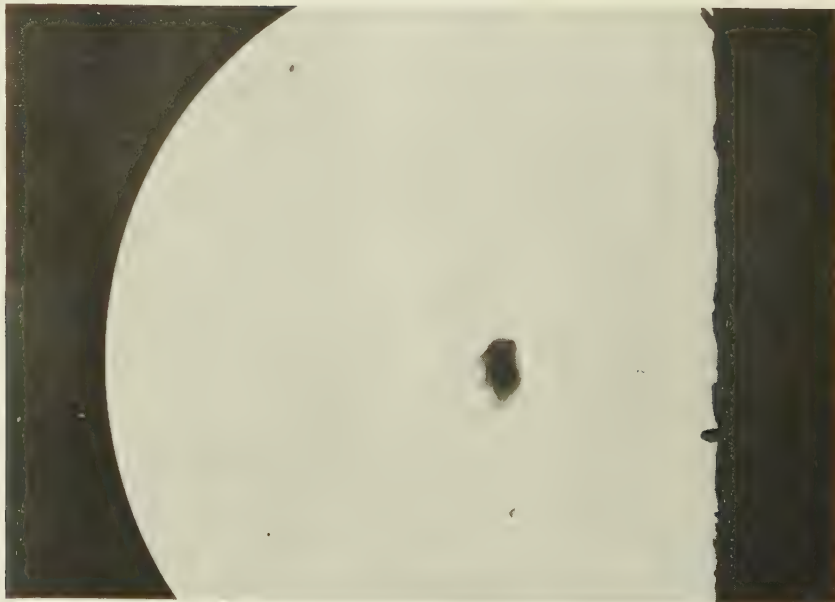


Abb. 55: Vergr. 3800 x 2

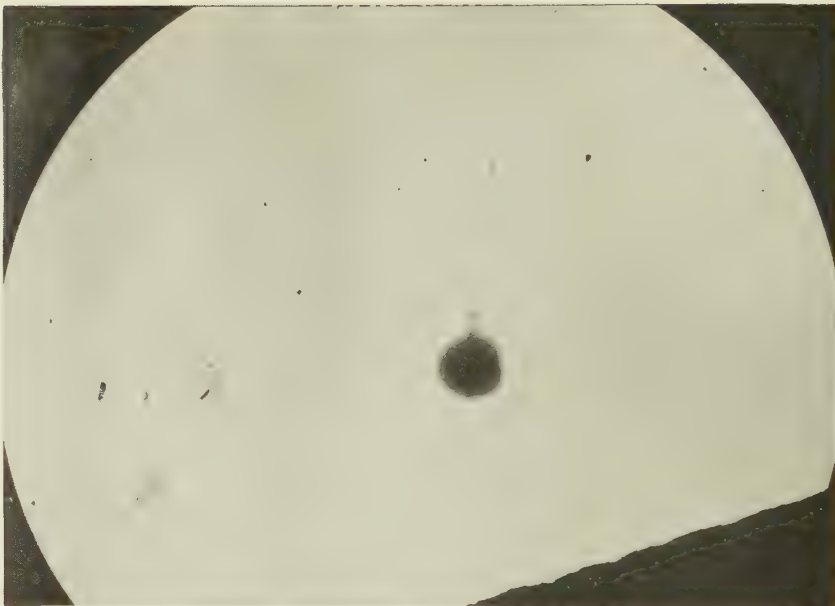


Abb. 56: Vergr. 3800 x 2

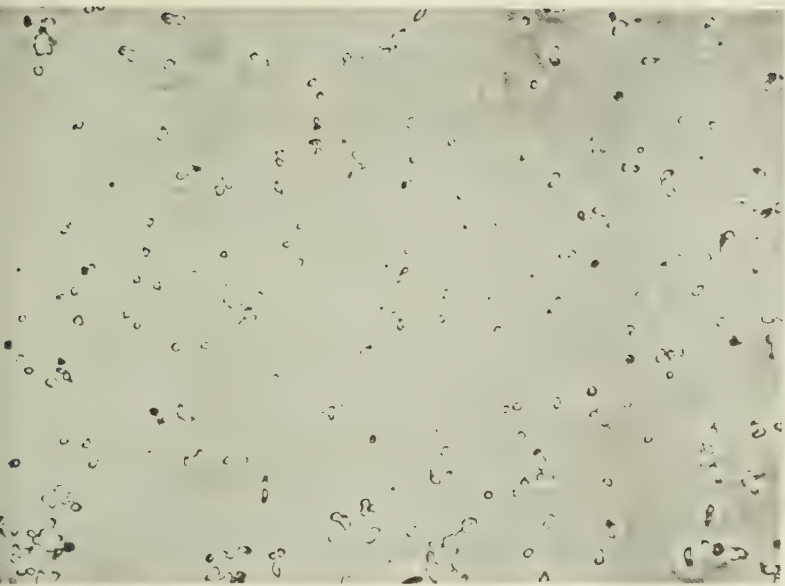


Abb. 57: Thrombocyten frei-
schwebend fixiert

Die Wirkung von Sequestren auf Thrombocyten.
Di-Na-Sequestren, (200 mg%), Plättchen freischwebend fix.





Abb. 59: Vergr. 3800 x 2

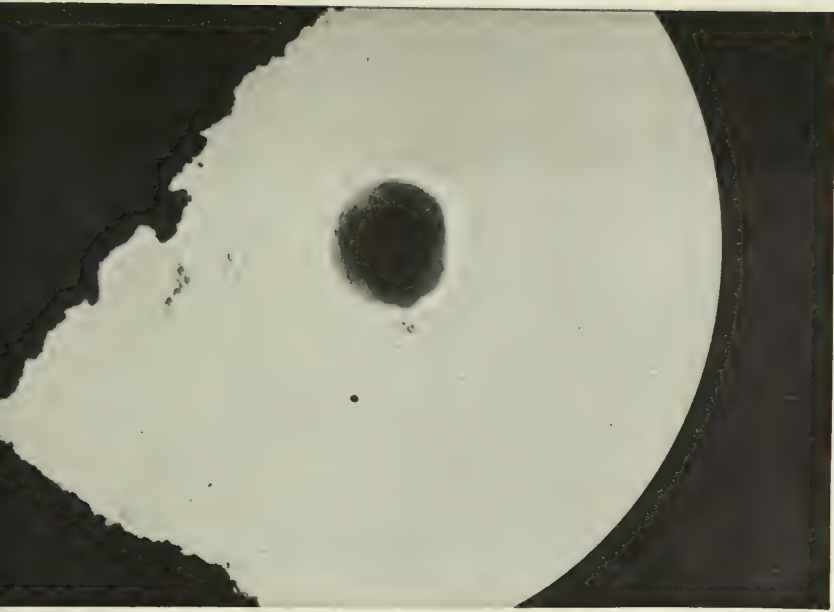


Abb. 60: Vergr. 3800 x 2

Die Wirkung von Sequestren auf Thrombocyten.
Verschiedene Sequestren-Salze im Vergleich



Abb. 61: Mg-Sequestren 200 mg%



Abb. 62: Neodym-Sequestren 200 mg%

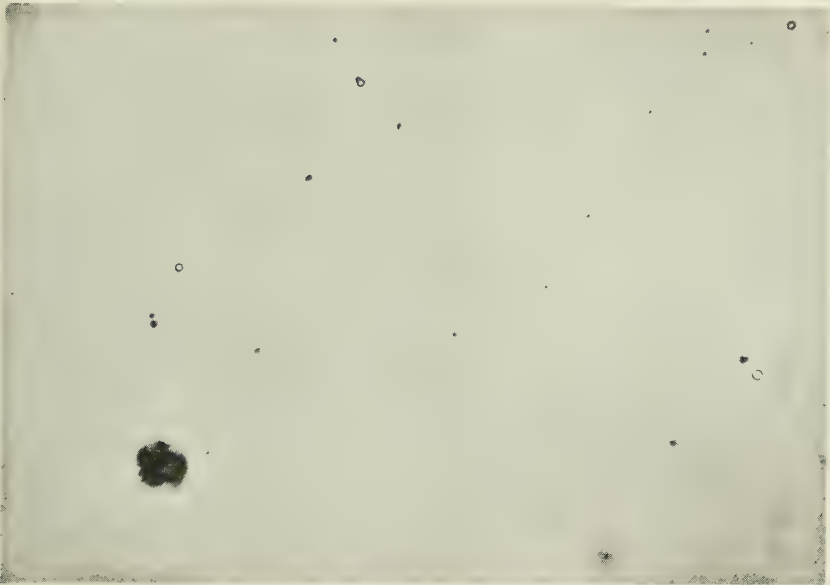


Abb. 63: Tetra-Novocain-
Sequ. 500 mg%



Abb. 64: Di-Na-Sequestren
200 mg%

Die Wirkung von Sequestren auf Thrombocyten
Mg-Sequestren (200 mg%), Haftpräparat



Abb. 65: Vergr. 1000 x 2

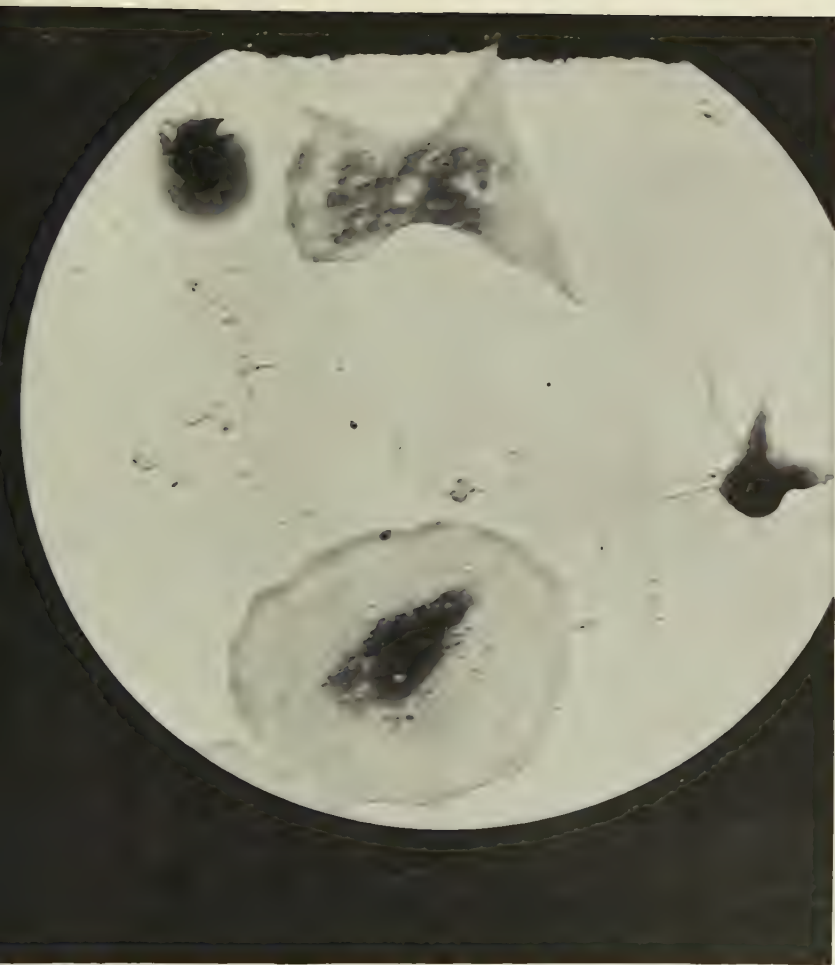


Abb. 66: Vergr. 3800 x 2

Die Wirkung von Sequestren auf Thrombocyten.
Neodym-Sequestren (200 mg%), Haftpräparat



Abb. 67: Vergr. 1000 x 2



Abb. 68: Vergr. 3800 x 2

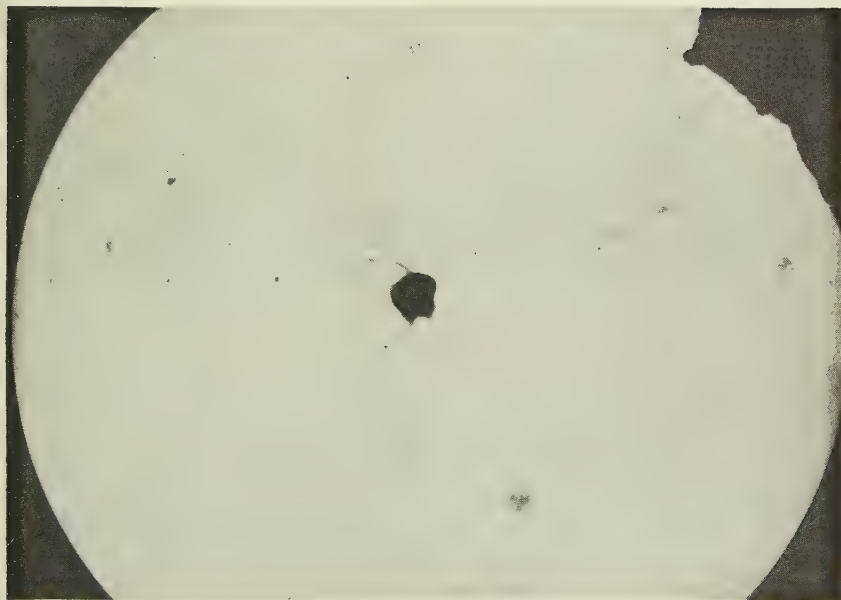


Abb. 69: Vergr. 3800 x 2

Thrombocyten nach der Einwirkung von Thrombodium
Thrombodium (15 mg%), Haftpräparat

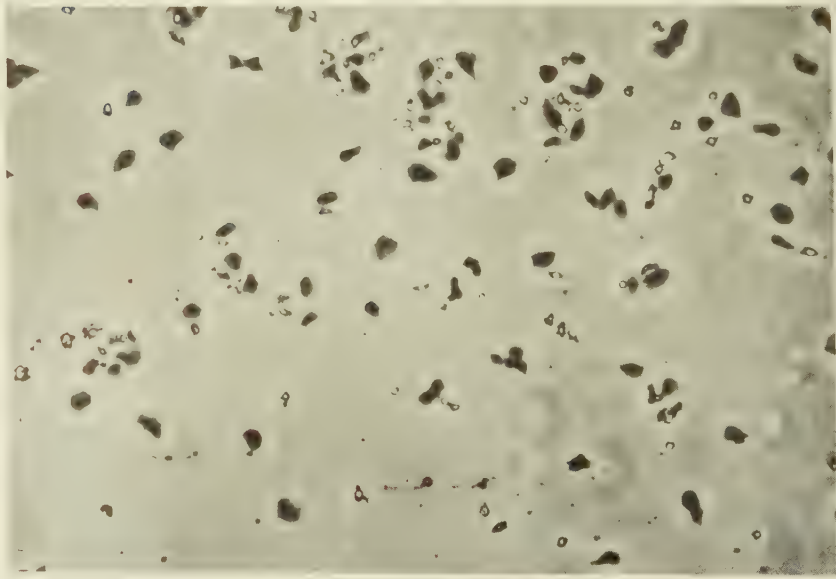


Abb. 70: Phasenkontrast-
aufnahme

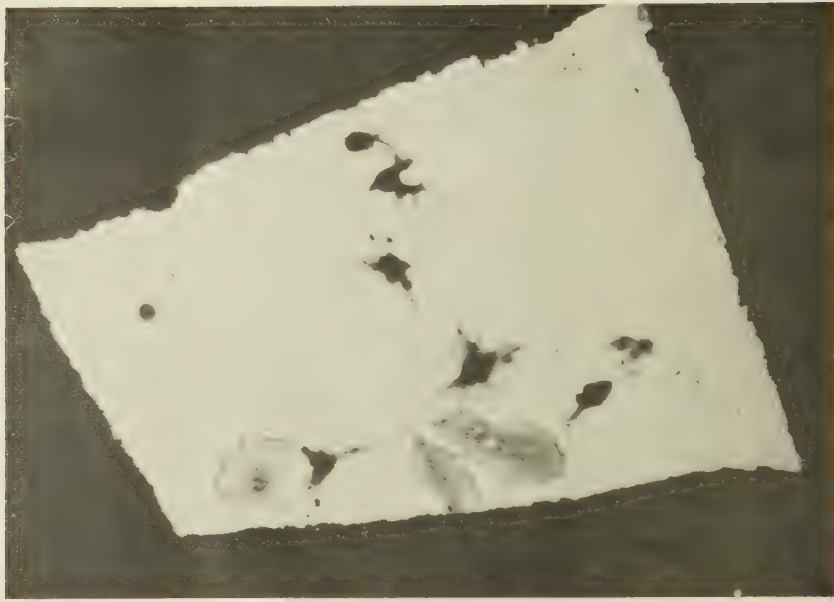


Abb. 71: Vergr. 1000 x 2



Abb. 72: Vergr. 3800 x 2

Thrombocyten nach der Einwirkung von "Sequestrenoiden".
Novocain-Thrombocyten



Abb. 73. Novocain 500 mg.



Abb. 74. Novocain 400 mg.



Abb. 75: Novocain 15 mg%
+ Na-Citrat 400 mg%



Abb. 76: Novocain 150 mg%
+ Na-Citrat 400 mg%

Thrombocyten nach der Einwirkung von "Sequestrenoiden".
Novocain-Thrombocyten



Abb. 77: Novocain 200 mg%



Abb. 78: Novocain 400 mg%

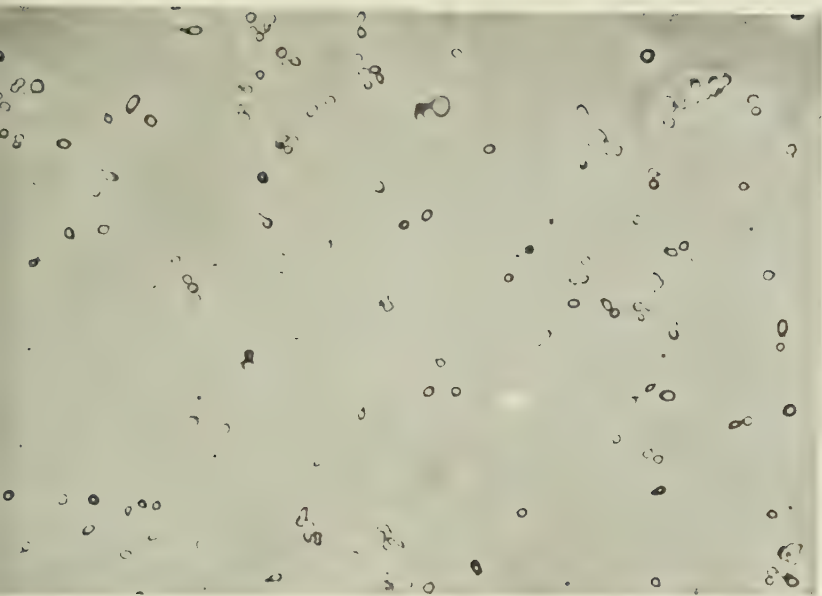


Abb. 79: Novocain 200 mg%
+Na-Citrat 400 mg%
Thrombocyten freischw. fix.

Thrombocyten nach der Einwirkung von "Sequestrenoiden".
Novocain (200 mg%) + Na-Citrat (400 mg%)
Thrombocyten freischwebend fixiert



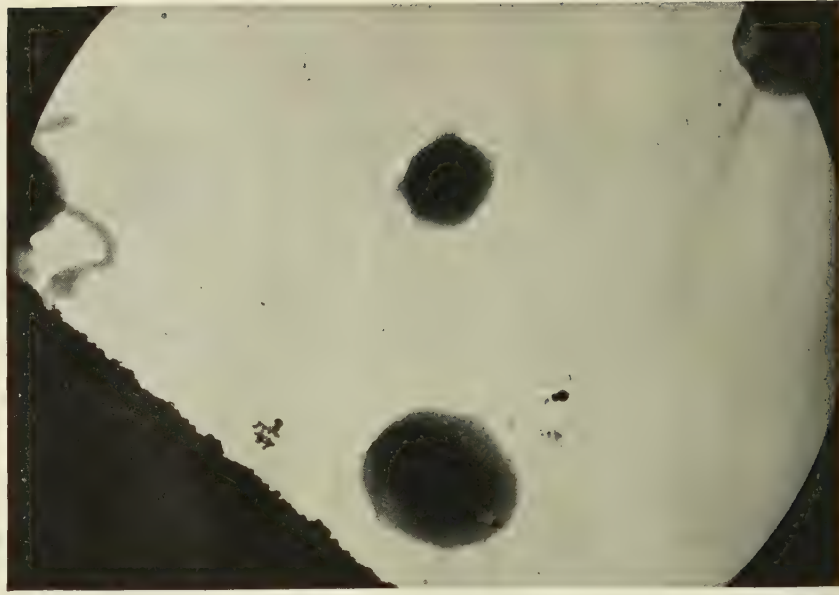
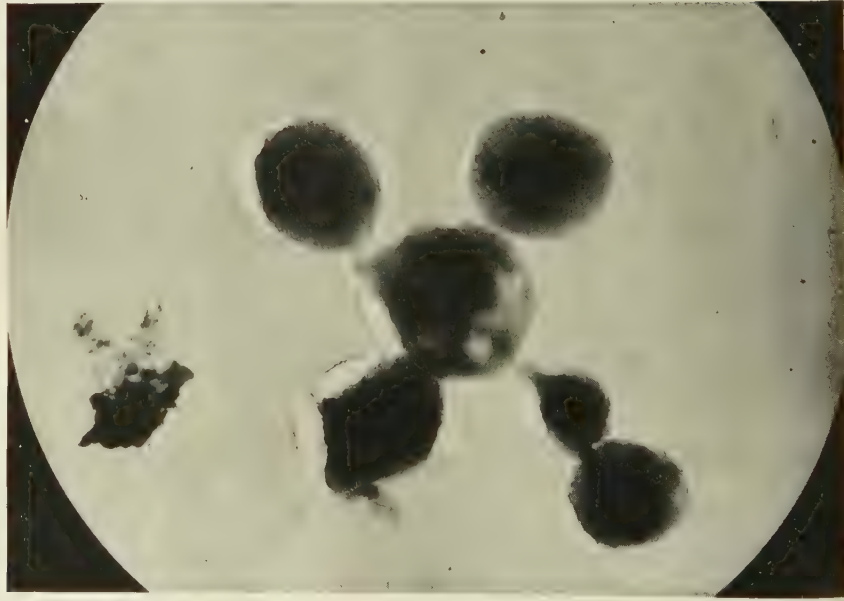


Abb. 81: Vergr. 1000 x 2

Thrombocyten nach der Einwirkung von "Sequestrenoiden".

Novocain-Thrombocyten (freischwebend fixiert) im

Vergleich zu einem Nativblut-Plättchen (Zirkulationsform) Vergrößerung für Abgn 82-85: 3800 x 2



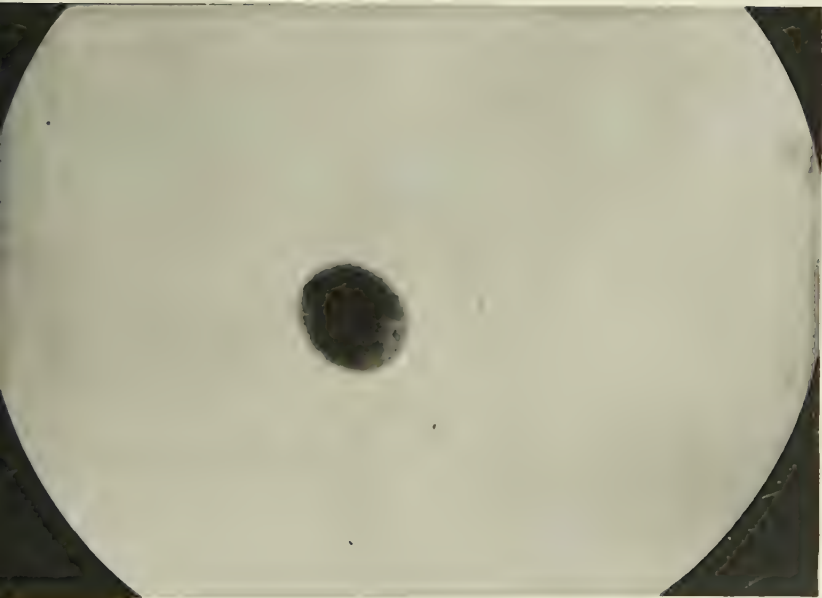


Abb. 84: Novocain 200 mg%
+ Na-Citrat 400 mg%



Abb. 85: Nativblut, Haftpräp.
2 min nach Blutentnahme fix.

Thrombocyten nach der Einwirkung von "Sequestrenoiden"
Prüfung, ob die durch Novocain bedingte Hemmung der Evol



Abb. 86: Novocain 200 mg%, +Na-Citrat 400 mg%
Novocain ausgewaschen und von der Thrombocyten-
Suspension in üblicher Weise Haftpräparat hergestellt
(120 min nach Blutentnahme fixiert).

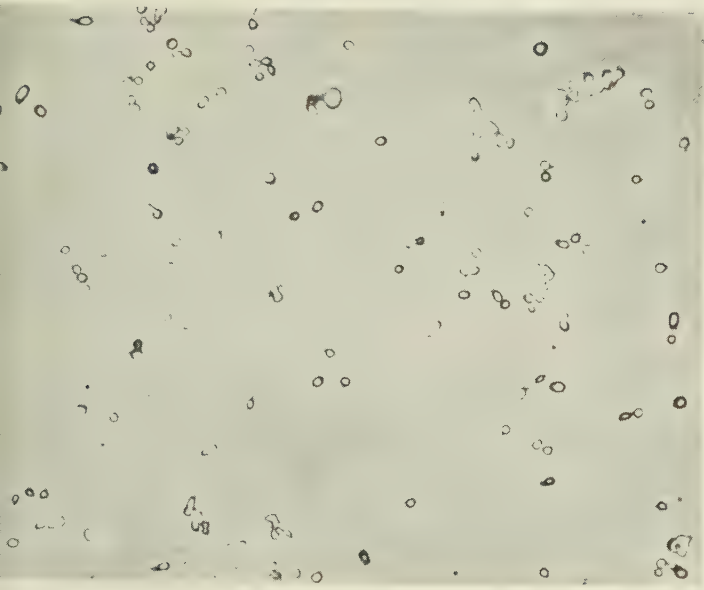


Abb. 87: Novocain 200 mg%, +Na-Citrat 400 mg%
Thrombocyten unter voller Novocainwirkung freischwebend
fixiert (30 min nach Blutentnahme).

Thrombocyten nach Einwirkung von "Sequestrenoiden".
Konzentrations-Spektrum für Coramin (15-400 mg%)



Abb. 88. Coramin 400 mg%



Abb. 89. Coramin 200 mg% + Na-Citrat 400 mg%



Abb. 90: Coramin 400 mg%
+ Na-Citrat 400 mg%

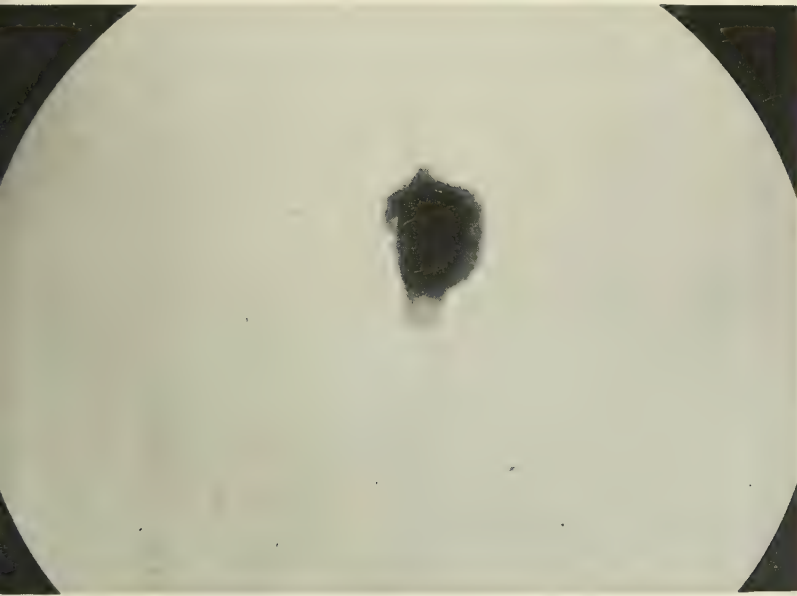
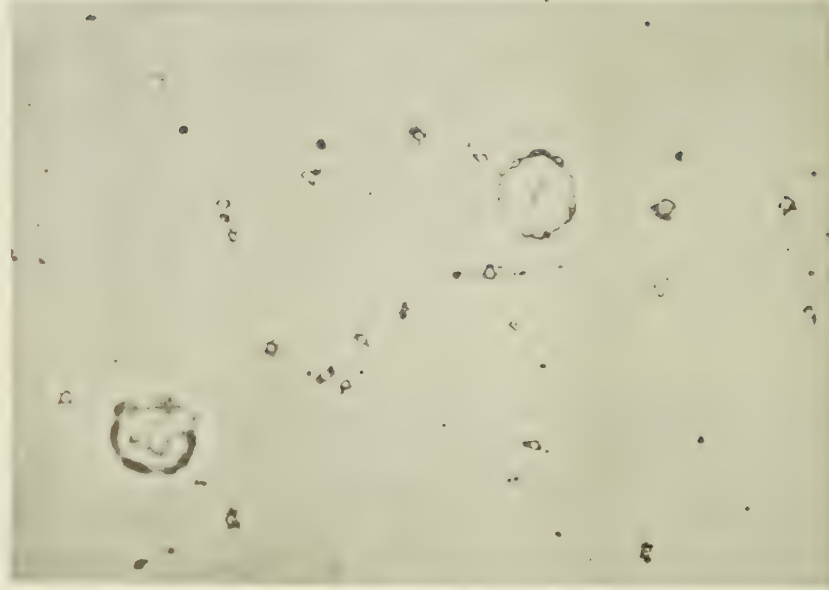


Abb. 91: Coramin 400 mg%
+ Na-Citrat 400 mg%
Vergr. 3800 x 2

Pathologisches Blut.

Thrombocyten einer Patientin mit Thrombasthenie NAEGELI
bei Zusatz von Na-Citrat (400 mg%), Haftpräparat



Herrn Oberarzt Privatdozent Dr. R. MARX, meinem Doktorvater, danke ich für die Überlassung des Themas und dafür, dass er mich im Verlauf der experimentellen Arbeit stets bereitwillig unterstützte.

Herrn Professor Dr. ROLLWAGEN und Herrn Dozent Dr. KINDER möchte ich für ihr freundliches Entgegenkommen danken, die elektronenoptischen Untersuchungen im II. Physikalischen Institut der Universität München vornehmen zu können.

Ferner bin ich Herrn Dr. S. DERLATH zu Dank verpflichtet, dass er mir für die lichtoptischen Aufnahmen liebenswürdigerweise sein Phasenkontrastmikroskop samt Fotozubehör zur Verfügung stellte.

Ebenfalls möchte ich mich bei Fräulein Y. R. SCHLEUSSING für die Liebe und Geduld bedanken, die sie für die Ausführung der fotografischen Vergrößerungen aufwandte.

LITERATURVERZEICHNIS

- Bessis, M. C.R. Soc. Biol., Paris 142, 647 (1948)
- Bessis, M. A. Rév. d' Hématol. 3, 48, 69 (1948)
- Burstein, M.
- Bloom Zeitschr. f. Zellforschung Bd 42, 365-385 (1955)
- Braunsteiner, H. Wien. Zeitschr. f. Inn. Med. 30, 448 (1949)
31, 450 (1950)
Acta haematol. 3, 163, 170, (1950)
- Derlath, S. Dissertation, München (1956)
- Fonio, A. und Die Thrombocyten des menschlichen Blutes
Schwendener, J. und ihre Beziehung zum Gerinnungs- und
Thrombosevorgang.
Med. Verlag Hans Huber, Bern (1942)
- Green, W. R. Effekt of pH on platelets and identification
of ribonucleoprotein from platelets.
Proc. Sec. f. Exp. Biol. and Medicin 87, 412
(1954)
- Koeppel, G. Ein Beitrag zur Funktionsmorphologie der
normalen Thrombocyten des Menschen im
Nativblut.
Dissertation, München (1955)
- Marx, R. Hämostaseologie
Habilitationsschrift, München (1953)
- Marx, R. und Zeitschrift "Blut", im Druck (1957)
Derlath, S.
- Michaelis, L. Biochem. Zeitschr. 234, 139 (1931)
- Wolpers, C. und Klin. Wochenschr. 1077 (1939)
Ruska, H.

LEBENS LAUF

Am 5. September 1930 wurde ich, Karlheinz Köhl, in Schollkrippen im Spessart geboren. Mein Vater, Dr. med. Heinrich Köhl, war dort bis zu seinem Tode als praktischer Arzt tätig. Meine Mutter, Margarete Köhl, geb. Engert, wohnt noch dort.

Nach vierjähriger Volksschulzeit besuchte ich von 1941 bis 1942 das Realgymnasium in Würzburg, dann das Alte Gymnasium bis zu seiner Zerstörung im März 1945.

Nach einjähriger Unterbrechung - ich lebte während dieser Zeit bei meinen Eltern - konnte ich die Schulausbildung am Humanistischen Gymnasium Münnerstadt fortsetzen und mit Ablegen der Reifeprüfung im Juli 1950 beenden.

Vom Wintersemester 1950 an studierte ich zunächst Naturwissenschaften (Hauptfach Physik) an den Universitäten Würzburg und Marburg.

Das Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1953 an der Universität Erlangen und beendete dort auch mit bestandener ärztlicher Vorprüfung im Juli 1954 die vorklinische Studienzeit.

Für die klinischen Semester war ich seit November 1954 an der Universität München immatrikuliert.

